Aus dem Anatomischen Institut der Freien Universität
Berlin-Dahlem

DIE RESISTENZ DER METACHROMASIE GEGEN SÄUREN

Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Zahnarzt Eduard Funk
aus Dinkelsbühl

1972

Aus dem Anatomischen Institut der Freien Universität
Berlin-Dahlem

DIE RESISTENZ DER METACHROMASIE GEGEN SÄUREN

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Zahnarzt Eduard Funk
aus Dinkelsbühl

Referent : Prof. Dr. med. Karlheinz Toepfer

Korreferent : Prof. Dr. med. Friedrich Körber

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 6. November 1972

UNIV. LEIDEN BIBL.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	3
3.	Befunde	6
4.	Diskussion	25
4.1.	Die metachromatische Reaktion (MR)	25
4.1.1.	Definition des Begriffs "Metachromasie"	25
4.2.	Metachromatische Farbstoffe	29
4.3.	Metachromatische Substanzen	33
4.4.	Die Ursachen der Metachromasie	36
4.5.	Die metachromatische Reaktion am histologischen Präparat und in vitro	42
4.6.	Die Resistenz der metachromatischen Reaktion	44
4.7.	Die Problematik der Vergleichbarkeit der speziellen Befunde im Schrifttum.	46
4.8.	Der Einfluß der Wasserstoffionen-Konzentration auf die metachromatische Reaktion.	51
4.9.	Die Wirkung der anorganischen und organischen Säuren als Störfaktor.	54
4.10.	Acidität und Störfaktorwirkung	58
4.11.	Die Bedeutung des Lösungsmittels (H_2O) für die metachromatische Reaktion.	71
4.12.	Metachromasie und Dielektrizitätskonstante.	83
4.13.	Die Resistenz der metachromatischen Reaktion am histologischen Präparat	90

Seite

4.14. Kritische Betrachtungen zur Untersuchung der metachromatischen Reaktion in Lösung und am histologischen Präparat 95

5. Zusammenfassung 100

6. Abbildungsteil 102

7. Literaturverzeichnis

Einleitung

Die metachromatische Reaktion im klassischen, histologischen Sinn stellt einen spezifischen, färberischen Nachweis für saure Mucopolysaccharide dar. Sie ist neben der Anwendung der PAS (Perjodsäure-Schiff)-Reaktion und Alcianblau-Färbung eines der gebräuchlichsten Verfahren zur Differenzierung dieser makromolekularen Substratgruppe.

Die Bedeutung der Mucopolysaccharide beruht auf deren ubiquitärem Vorkommen in fast allen Geweben, Organen und Sekreten des Körpers. Vielfach handelt es sich um Substanzen von zentraler physiologischer und pathologischer Bedeutung, wie Heparin, die Blutgruppensubstanzen, bestimmte Bakterien-Polysaccharide, Substanzen des Knorpel-und Knochenstoffwechsels etc. Im Gegensatz zu den Nachweismethoden mit PAS und Alcianblau bzw. entsprechenden Modifikationen und Kombinationen bietet die metachromatische Reaktion bereits aus sich selbst heraus (zunächst in vitro) die Möglichkeit einer Differenzierung, da die Art des metachromatischen Farbwechsels hier substratspezifisch ist.

Zwar liegt die Prägung des Begriffs "Metachromasie" durch EHRLICH (1879) annähernd ein Jahrhundert zurück, doch bestehen trotz des umfangreichen Schrifttums sowohl über die Definition als auch die theoretischen Grundlagen dieses bei bestimmten Farbstoffgruppen (Thiazine, Akridine, Oxazine etc.) auftretenden Effekts noch heute keine einheitlichen Vorstellungen.

Seit EHRLICH hat sich die praktische Bedeutung der metachromatischen Reaktion erheblich gewandelt. Ursprünglich nur als zusätzliche Bereicherung der histologischen Färbepraxis mit verbesserten morphologischen Differenzierungsmöglichkeiten verstanden, liegt das Hauptgewicht dieser Reaktion heute

fast ausschließlich auf dem Gebiet des histotopochemischen Mucopolysaccharid-Nachweises. Die Erkenntnis, daß sich die Spezifität dieser Reaktion nicht im allgemeinen Nachweis von Mucopolysacchariden erschöpft, sondern daß die Metachromasie einzelner Chromotrope signifikante Unterschiede im Verhalten gegenüber Änderungen des Reaktionsmilieus aufweist, führte zum Bemühen vieler Autoren, diese Unterschiede experimentell zu objektivieren. Meist geschieht dies durch Anwendung von Substanzen (z.B. Säuren), die in der Lage sind, die metachromatische Reaktion partiell oder vollständig zu unterdrücken. Vergleichbare, exakte Meßergebnisse setzen jedoch auch hier Farbstoffe von hohem Reinheitsgrad in ständig gleichbleibender Qualität voraus. Da diese bislang nicht zur Verfügung standen, fehlen bis heute umfassende quantitative Angaben über den Einfluß von Störfaktoren auf die Reaktion von Mucopolysacchariden mit Thiazin-Farbstoffen fast vollständig.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Reaktion bei definierten chromotropen Substanzen in vitro mit dem Ziel angewendet, die Wechselbeziehung bestimmter metachromatischer Verbindungen mit Säuren isoliert untersuchen zu können, da die Weiterentwicklung der Mikrospektrophotometrie erfolgversprechende Ansatzpunkte für entsprechende quantitative Messungen auch am histologischen Präparat bieten kann.

Material und Methoden

Folgende Thiazin-Farbstoffe wurden in allen Versuchsanordnungen verwendet:

Azur A (Dimethylthionin) : Serva (Charge A)
Farbstoffgehalt 93% (Din 58981)

Toluidinblau (2-Amino-7-dimethylamino-3-methyl-diphenaz-thioniumchlorid : Eastmann (Charge NU 26 - Serva, Heidelberg)
Farbstoffgehalt 92% (Din 58981)

Nähere physikalisch-chemische Daten (Löslichkeit etc.) sowie spektrales Verhalten dieser Farbstoffe in TOEPFER (1970c) und Farbstoffe in Medizin und Biologie (Din 58981).

Als Chromotrope wurden folgende Substanzen verwendet:

Monocarboxymethylcellulose, Natrium-Salz:		Serva 16110
Alginsäure, Ammonium-Salz	:	Schuchardt AL 219
Chondroitinsulfat, Natrium-Salz	:	Serva 17120
Heparin, Natrium-Salz	:	Deutsche Kabi 6814
λ-Carrageen	:	Sigma, Missouri/USA 128 B - 1120
SP_{54} (sulfatiertes Polyanion), Natrium-Salz	:	Bene-Chemie
Dextransulfat	:	Serva 18707

Zu Vergleichszwecken wurden außerdem folgende Polysaccharide herangezogen:

Carboxymethylcellulose, Natrium-Salz	:	Schuchardt TY 055
Polygalacturonsäure	:	Schuchardt PO 094
Chondroitinschwefelsäure, Natrium-Salz	:	Schuchardt CH 343
Heparin-Natrium	:	Serva 24590
Heparin	:	Deutsche Hoffmann-LaRoche AG G 603055

Dextransulfat, Natrium-Salz : Schuchardt DE 063

Als Störfaktoren wurden folgende Säuren (p.a. Fa. Merck) verwendet:
Salzsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure, Oxalsäure, Weinsäure, Citronensäure, Essigsäure.

Als Lösungsmittel für alle Substanzen diente durch Ionenaustauscher demineralisiertes Wasser (Leitfähigkeit < 2 S).

Farbstoff-Lösungen:
Von den Thiazinfarbstoffen wurden molare Lösungen (1×10^{-3}) unter Zugrundelegung des tatsächlichen Farbstoffgehaltes (Stickstoff-Analyse) angesetzt und für jeweils eine Woche in Kunststofflaschen luftdicht verschlossen als Stammlösung aufbewahrt. Durch laufende Kontrollmessungen wurden Zersetzung (Demethylierung) sowie das Entstehen der Leukoform (s. EPSTEIN, 1941) ausgeschlossen.

Die wässrigen Lösungen wurden 1×10^{-3} (Molarität berechnet auf wirksame Gruppen am Chromotrop) als Stammlösung jeweils frisch angesetzt.

Die Störfaktoren wurden im allgemeinen der fertigen metachromatischen Lösung nachträglich zugegeben.

Die spektrale Kontrolle der metachromatischen Bande wurde als Leerwert überprüft.

Die spektralphotometrischen Messungen erfolgten mit dem registrierenden Spektralphotometer RPQ 20A (Fa. Zeiss, Oberkochen) in Suprasilküvetten (Fa. Hellma, Mühlheim/Baden) im Bereich von 700 - 450 nm.

Die pH-Wert-Messungen erfolgten mit dem Acidometer der Fa. Knick, Berlin (Typ Nr. 350) und den Einstabmeßelektroden Nr. 405 (Fa. Ingold, Frankfurt/Zürich) für den sauren und neutralen Bereich.
Die Registrierung der pH-Werte erfolgte bei Zimmertemperatur ($20^{\circ}C$).

Zwecks vergleichender Darstellung in den Abbildungen wurden die abgelesenen Extinktionswerte in den spezifischen molaren Extinktionskoeffizienten ε umgerechnet.

Für die histologischen Untersuchungen wurden unfixierte Kryostatschnitte (10μ) von Trachea und Colon der Ratte (Whistar) in 5 x 10^{-4} molaren wässrigen Lösungen von Azur A und Toluidinblau gefärbt. Nach kurzem Spülen in demineralisiertem Wasser wurden diese unterschiedliche Zeiten in Säurelösungen verschiedener Konzentrationen (siehe 4.13) eingestellt. Danach wurden die Präparate mit demineralisiertem Wasser gespült und in Karion F (Fa. Merck) eingeschlossen. Die metachromatische Reaktion wurde sofort und nach mehreren Tagen beurteilt. Dabei konnten keinerlei Differenzen im Ausfall der Reaktion festgestellt werden.

3. Befunde

Um einerseits der Problematik einer fehlenden Vergleich barkeit und Reproduzierbarkeit aus dem Wege zu gehen, und an dererseits ein den Verhältnissen am histologischen Präparat nah zu ideal angeglichenes Verhältnis von Farbstoff/Chromotrop auc bei der Untersuchung der Metachromasie in vitro zu erhalten, wurden zur Erstellung der hier vorliegenden Ergebnisse ausschließlich die von TOEPFER (1972b) berechneten optimalen (stöchiometrischen) Verhältnisse von Farbstoff/Chromotrop der Konzentration $2,5 \times 10^{-5}$ verwendet.

Der Einfluß steigender Säurekonzentrationen auf die meta chromatische Reaktion in wässrigen Lösungen (frei von sonstige Salz- bzw. Pufferzusätzen) wurde in einzelnen Reihen jeweils für ein Farbstoff-Chromotrop-Gemisch mit den jeweiligen Säure als Störfaktor (ca. 15 - 20 Einzelkonzentrationen) untersucht.

Die in der vorliegenden Arbeit benutzten Bandenbezeichn gen sollten - da im Schrifttum die Bezeichnung der einzelnen Banden nicht einheitlich ist (z.B. "M"-Bande für α-Bande, "H" Bande für γ-Bande: MCKAY und HILLSON, 1965) - in einer kurzen Begriffserklärung definiert werden:

α-Bande: Absorption des einwertigen Farbstoff-Kations

β-Bande: Dimerer Zustand der einwertigen Farbstoff-Kationen

γ-Bande: Aggregationszustand von jeweils vier Farbstoff-Kationen (TOEPFER, 1970a; ZANKER, 1952a) (im Schrifttum häufig ungenau als polymer bezeichnet oder auch fälschlicherweise für die metachromatische μ-Bande benutzt).

μ-Bande: Metachromatische Bande der Farbstoff-Kationen an Polysaccharid-Anionen.

Zur Beurteilung des spektralen Bildes des jeweiligen Zustandes einer metachromatischen Lösung wurde prinzipiell die α-Bande herangezogen. Sie reagiert wesentlich empfindlicher auf die

Zugabe von Störfaktoren als die μ-Bande und ergibt durch bedeutend höhere Extinktionswerte ein genaueres Maß für die jeweils zerstörte metachromatische Reaktion (s. Abbildung 1).

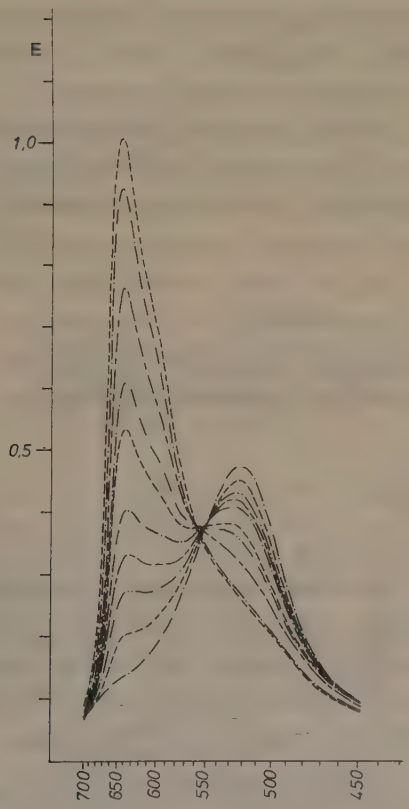


Abb. 1. Anstieg der α-Bande (632 nm) durch Unterdrückung der metachromatischen Reaktion von Toluidinblau mit Dextransulfat bei steigender Konzentration von Citronensäure.

Die Ablesung der α-Bande erfolgte beim tatsächlichen Maximum bzw. der entsprechenden Schulter und nicht bei der Wellenlänge der voll ausgebildeten monomeren (orthochromatischen) Bande, da die registrierte α-Schulter (ebenso wie der voll ausgebildete Peak) um einige (5 - 8) nm verschoben sein kann. Auf die Verschiebung der monomeren Bande in Gegenwart von hohen Konzentrationen einiger organischer Säuren wird an anderer

Stelle eingegangen. Ein Wechselspiel zwischen zwei eng benachbarten Banden führt bei zu geringer Extinktionshöhe einer der beiden Banden zu einem mehr oder weniger starken "Verschlucken" durch die jeweils benachbarte stärkere Bande. Von praktischer Bedeutung ist dieses Phänomen dann, wenn eine im Ansatz vorhandene α-Schulter um mehrere nm an die fast vollständig erhaltene β-Bande herangezogen wird. So besteht z.B. auch bei der Verwendung von nicht registrierenden Spektralphotometern die Gefahr, durch eine Messung bei der theoretischen Wellenlänge einer bestimmten Bande nicht den jeweils höchsten Extinktionswert als Ergebnis zu erhalten. Die gegenseitige Beeinflussung eng benachbarter Banden haben auch KORTÜM (1962) und MEIER (1963) eingehend beschrieben. Die gemessenen Extinktionswerte wurden unter Berücksichtigung der Schichtdicke und Farbstoffkonzentration nach dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz

$$E \doteq \log \frac{I_o}{I_d} = \varepsilon \cdot c \cdot d \qquad \varepsilon = \frac{E}{c \cdot d}$$

in den spezifischen molaren Extinktionskoeffizienten ε umgerechnet. Hierbei entsprechen E der gemessenen Extinktion, I_o der Intensität des eingestrahlten, I_d der Intensität des durchgelassenen Lichts, ε dem spezifischen molaren Extinktionskoeffizienten, c der Konzentration und d der Schichtdicke. Die Verwendung von ε bietet den Vorteil einer jederzeit möglichen Variation von Schichtdicke und Farbstoffkonzentration mit einwandfreier Vergleichsmöglichkeit sowohl innerhalb der eigenen Befunde als auch mit den Ergebnissen anderer Autoren, unabhängig von den jeweiligen speziellen Versuchsanordnungen.

Bei Betrachtung der bei der Zerstörung der Metachromasie maximal erreichten ε-Werte fällt auf, daß diese erheblich unter den in der Literatur für den rein monomeren Zustand der

Farbstoffe in Lösung angegebenen Werten liegen (TOEPFER, 1970c). Dieser Maximalwert von 46.000 für Azur A und 60.000 für Toluidinblau liegt in rein wässriger Lösung nur im Bereich von 10^{-6} bis 10^{-7} molar Farbstoff vor. Deshalb werden bei den vorliegenden Untersuchungen im Bereich von $2,5 \times 10^{-5}$ molar Farbstoff diese Höchstwerte nicht erreicht.

Die vergleichsweise zu Azur A niedrigeren Werte für Toluidinblau sind durch eine stärkere Dimerisation dieses Farbstoffs bedingt, welche auf einer größeren Molekülober-fläche dank der zusätzlichen Methylgruppe beruht (TOEPFER, 1970c).

Tabelle 1

Extinktionskoeffizient ε der α-Bande von Toluidinblau bei vollständig aufgehobener Metachromasie in % von ε in dünnster wässriger Lösung (ε = 60.000 = 100%).

	CMC	Alg	Ch-S	Carr	Hep	SP_{54}	DS
H_2SO_4	79	72	61	46	56	41	41
HCl	77	66	64	55	54	51	50
Oxals.	75	73	44	49	53	43	47
Weins.	77	69	51	44	62	49	49
Phosphors.	78	63	53	42	44	32	35
Essigs.	59	55	41	45	56	49	42
Citronens.	77	60	41	45	55	50	46

Die Entstehung der μ-Bande (z.B. bei kontinuierlicher Chromotropzugabe) läßt die monomere und dimere Bande gleichermaßen abnehmen; abgesehen von der zusätzlichen Chromotrop- und Säurewirkung müßten also bei der Zerstörung der Metachromasie α- und β-Bande gleichermaßen ansteigen. Bei höheren Konzentrationen anorganischer Säuren als Störfaktor wird jedoch die β-Bande zunehmend stärker und überragt zuletzt sogar die α-Bande, da aufgrund von beginnenden Dimerisations- bzw. Polymerisationserscheinungen hier ein weiterer

Anstieg der α-Bande verhindert wird.

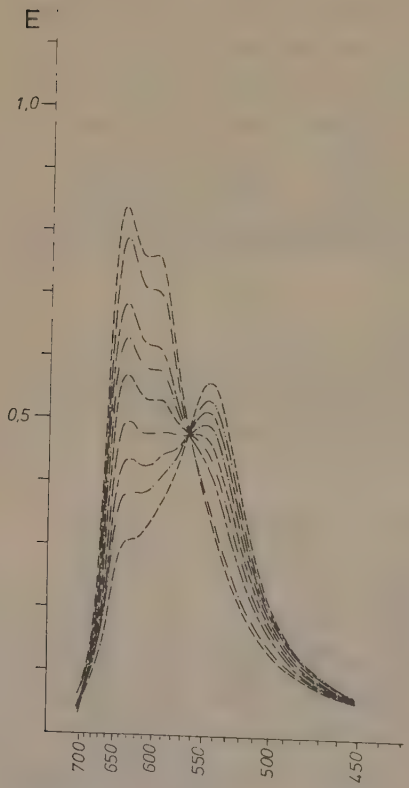


Abb. 2. Anstieg der α-Bande (632 nm) durch Unterdrückung der metachromatischen Reaktion von Toluidinblau mit Dextransulfat bei steigender Konzentration von Salzsäure. Deutlich ist der hohe Anteil an dimeren Farbstoff-Kationen zu erkennen.

Die Meßergebnisse in Form des Anstiegs der α-Bande, die durch steigende Säurekonzentrationen in einem bestimmten metachromatischen System erzielt wurden, sind jeweils als spezifischer molarer Extinktionskoeffizient ($\mathcal{E}$) der α-Bande gegen die Normalität der Säurekonzentration (als log) aufgetragen.

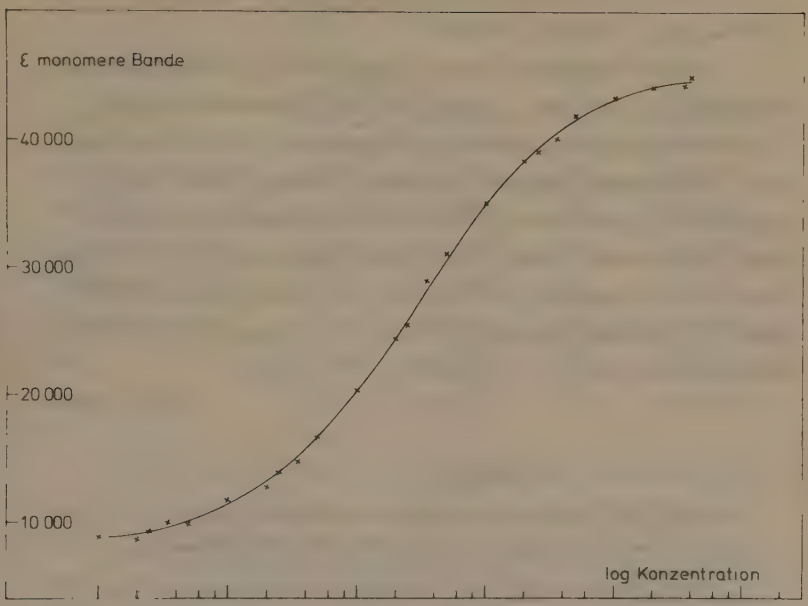


Abb. 3. Anstieg der α-Bande als Maß für die Zerstörung der Metachromasie in Abhängigkeit vom log der Säurekonzentration (jede Kurve repräsentiert ca. 15 - 20 Einzelmeßwerte).

Vergleicht man die unterschiedliche Lage der μ-Bande der hier untersuchten sieben Chromotrope bzw. ihren Abstand zur α-Bande des jeweiligen Farbstoffes in der Tabelle 2, so kann man erhebliche Differenzen feststellen (die μ-Bande ist im Gegensatz zur α- und β-Bande nicht farbstoffspezifisch, sondern in ihrer Lage und Höhe vom Chromotrop abhängig).

Für Azur A beträgt danach der Abstand zwischen α- und μ-Bande 82 - 116 nm und für Toluidinblau 85 - 110 nm (TOEPFER, 1971, im Druck). Je größer dieser Abstand im einzelnen metachromatischen System ist, umso eher (d.h. bei umso niedrigeren Extinktionswerten) kann anhand der Höhe der α-Ban-

de der Anteil der bereits durch Zerstörung entstandenen Farbstoff-Kationen bestimmt werden.

Dementsprechend werden aufgrund des unterschiedlichen Abstandes der α- und μ-Bande für die einzelnen Farbstoff-Chromotrop-Gemische differente Minimalwerte für die α-Bande in Form einer distinkten Schulter gefunden. Diese sind jedoch für ein bestimmtes Farbstoff-Chromotrop-Gemisch konstant, unabhängig davon, welcher Störfaktor für die Erscheinung dieser ersten geringen α-Inflexion verantwortlich ist, da die Lage der μ-Bande für jeden Farbstoff mit einem bestimmten Mucopolysaccharid einen konstanten Wert zeigt.

Tabelle 2

Lage der μ-Bande verschiedener metachromatischer Verbindungen von Azur A und Toluidinblau, Differenz von α- und μ-Bande sowie Startwert von ε bei Einwirkung von Störfaktor (TOEPFER, 1971).

Azur A
(α-Bande 630 nm)

	μ-Bande		α-μ	
Chromotrop	Lage	Höhe (ε)	nm	Start-Wert
Carboxymethylcell.	548	21.500	82	12.500
Alginat	545	22.100	85	12.000
Chondroitinsulfat	548	22.700	82	11.000
Carrageen	540	21.500	90	8.500
Heparin	534	21.500	96	7.000
SP_{54}	514	17.300	116	7.000
Dextransulfat	517	17.900	113	4.000

Tabelle 2 (Fortsetzung)

Toluidinblau
(α-Bande 632 nm)

Chromotrop	μ-Bande Lage	μ-Bande Höhe (ε)	α-μ nm	Start-Wert
Carboxymethylcell.	544	23.300	86	12.000
Alginat	545	23.600	85	12.000
Chondroitinsulfat	545	24.400	85	10.000
Carrageen	539	22.300	91	9.300
Heparin	534	20.700	96	6.000
SP_{54}	520	16.900	110	8.000
Dextransulfat	523	21.800	107	4.000

So ergibt sich aus dem Vergleich aller Meßwerte für die Höhe der bei steigender Konzentration des Störfaktors zuerst objektiv ablesbaren α-Schulter für jedes Farbstoff-Chromotrop-Gemisch ein einheitlicher Wert (Startwert). Dieser Wert, ausgedrückt in ε, stellt somit die gemeinsame Starthöhe für alle Kurven eines bestimmten Farbstoff-Chromotrop-Gemisches dar (s. Tabelle 2).

Für die Carboxylgruppen tragenden Chromotrope Carboxymethylcellulose und Alginat liegt dieser Startwert auf der gleichen Höhe mit der schon selbst bei maximaler Metachromasie vorhandenen geringen monomeren Schulter. Die Ursachen für das Vorhandensein dieser auch in einer mit Chromotrop abgesättigten Farbstoff-Lösung noch existierenden monomeren Farbstoff-Ionen, die auch von anderen Autoren (LEVINE und SCHUBERT, 1952) bereits festgestellt wurden, sind bisher ungeklärt.

Aus der Abb. 3 ist ersichtlich, daß die sukzessive Abnahme des Kurvenanstiegs in höheren Säurekonzentrationen eine präzise Angabe der als Vergleichsmaßstab dienenden Endkon-

zentration des jeweiligen Störfaktors bei vollständig aufgehobener Metachromasie erschweren kann. Dagegen ist jedoch eine genaue Festlegung der maximalen ε-Werte für die α-Bande sehr gut möglich (ε_{max} der α-Bande).

Für den zahlenmäßigen Vergleich der Wirksamkeit aller untersuchten Störfaktoren wurde deshalb diejenige Säurekonzentration bestimmt, die jeweils für einen bestimmten Prozentsatz des jeweiligen Anstiegs der α-Bande von ε_{max} der α-Bande, also bei vollständig zerstörter Metachromasie, erforderlich war. Diese Prozentsätze (75%, 50% und 25%) wurden deshalb wie folgt berechnet:

$$75\% = \frac{(100\% - \varepsilon_{Startwert}) \times 3}{4}$$

$$50\% = \frac{100\% - \varepsilon_{Startwert}}{2}$$

$$25\% = \frac{100\% - \varepsilon_{Startwert}}{4}$$

Zwar erfolgte der Vergleich der Störfaktoren in der Regel beim 50%-Wert von ε, doch kommt auch den 25%- und 75%-Werten eine gewisse Bedeutung zu, da sie in grober Annäherung den Bereich des beginnenden steilen Kurvenanstiegs (25%-Wert) repräsentieren und damit zusätzliche Vergleichsmöglichkeiten schaffen.

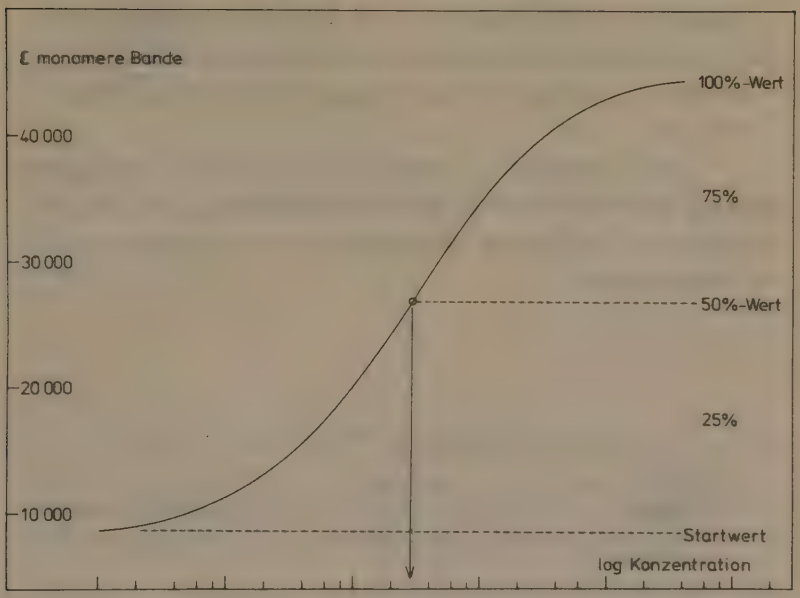


Abb. 4. Schematische Darstellung des 25%-, 50%-, 75%- und 100%-Werts von $\varepsilon_{\alpha\text{-Bande}}$. (100% = vollständig aufgehobene Metachromasie).

Die durch Verwendung von einer Reihe von Säuren als Störfaktoren für die metachromatischen Systeme der Farbstoffe Azur A und Toluidinblau mit insgesamt sieben Chromotropen erhaltenen Ergebnisse wurden unter zwei Gesichtspunkten beurteilt:

1. Die unterschiedliche Resistenz der metachromatischen Bindung ("Metachromotropie", s. GRAUMANN, 1959 [1]) der un-

[1] Der Begriff "Metachromotropie" wird von GRAUMANN (1959) folgendermaßen definiert: "Metachromotropie ist die durch das Ladungsmuster bedingte Eigenschaft gewisser Substrate, im adsorbierten basischen Farbstoff das Auftreten einer metachromatischen Absorptionsbande (γ-Bande) bewirken zu können." (Gemeint ist hier aber die μ-Bande.) -

tersuchten Mucopolysaccharide mit Azur A und Toluidinblau gegenüber jeweils einer Säure als Störfaktor (Abb. 20 - 33).

2. Der unterschiedliche Einfluß aller verwendeten Säuren auf jeweils eine definierte metachromatische Verbindung (Abb. 34 - 47).

Das Verhalten der untersuchten Säuren sowie Polysaccharide sei (stellvertretend für die Kurvendarstellungen in den Abbildungen 20 - 47) anhand der folgenden vier Abbildungen (Abb. 5 - 8) dargestellt:

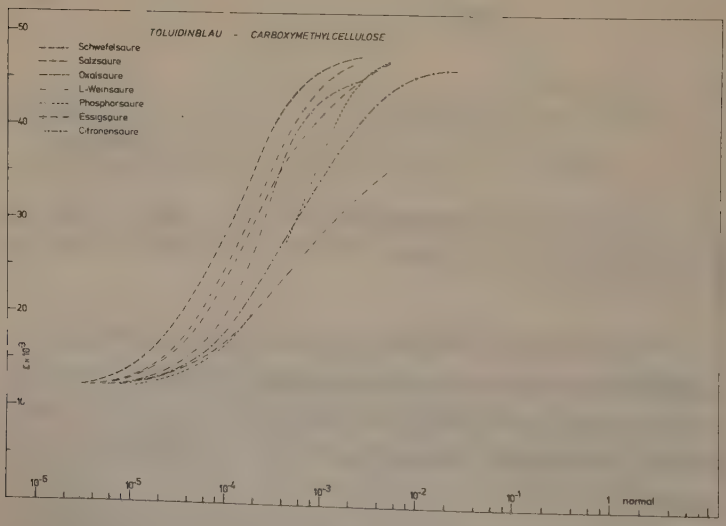


Abb. 5. Anstieg der α -Bande von Toluidinblau bei Zerstörung seiner metachromatischen Verbindung mit Carboxymethylcellulose durch steigende Konzentration verschiedener Säuren.

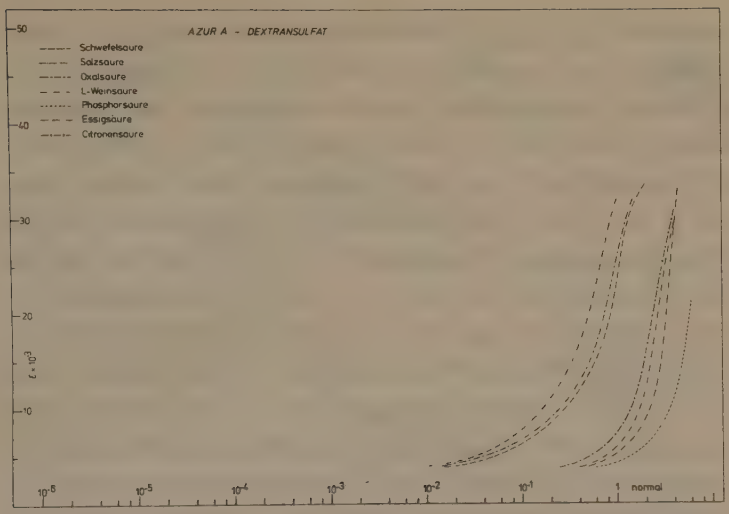


Abb. 6. Anstieg der α-Bande von Azur A bei Zerstörung seiner metachromatischen Verbindung mit Dextransulfat durch steigende Konzentration verschiedener Säuren.

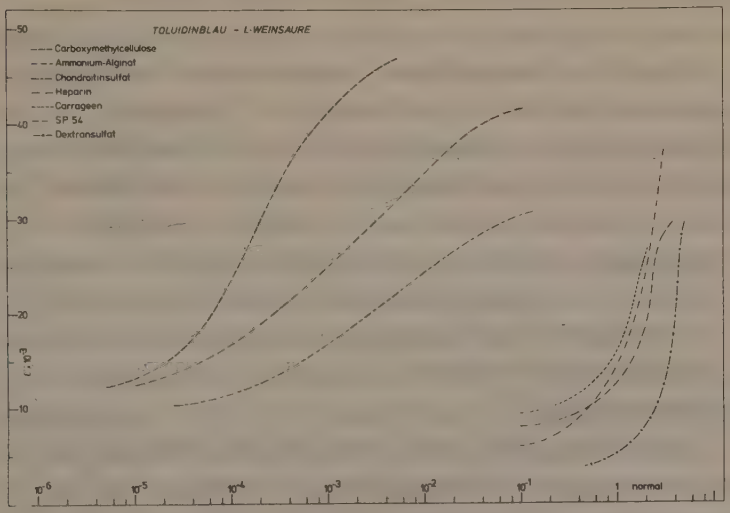


Abb. 7. Anstieg der α-Bande von Toluidinblau bei Zerstörung seiner metachromatischen Verbindung mit verschiedenen Chromotropen durch steigende Konzentrationen von Weinsäure.

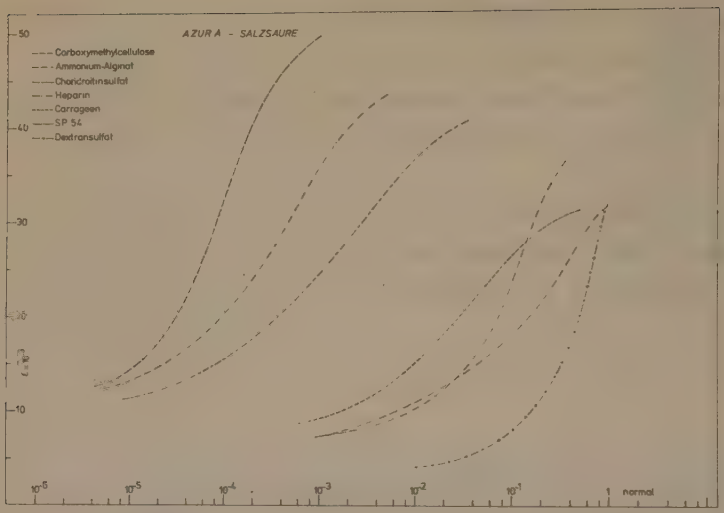


Abb. 8. Anstieg der α-Bande von Azur A bei Zerstörung seiner metachromatischen Verbindung mit verschiedenen Chromotropen durch steigende Konzentrationen von Salzsäure.

Bereits bei oberflächlicher Betrachtung der Kurvensysteme in den Abbildungen 5 -8 ist folgendes zu erkennen: Unter Einwirkung verschiedener Störfaktoren auf eine definierte metachromatische Verbindung (Abb. 5 und 6) sind die Kurven sowohl in Form als auch Steigung sehr ähnlich und zeichnen sich durch einen einheitlichen Startwert für ϵ aus. Die Abstände der Kurven untereinander sind vergleichsweise gering, da die zur vollständigen Auslöschung der metachromatischen Reaktion benötigten Säurekonzentrationen nur um ca. eine Zehnerpotenz differieren.

Läßt man dagegen einen bestimmten Störfaktor auf die metachromatischen Verbindungen eines Farbstoffs mit den sieben untersuchten Chromotropen einwirken, so bedarf es sehr unterschiedlicher Konzentrationen, um die Metachromasie in

jedem Fall vollständig zu unterdrücken (bis zu vier Zehnerpotenzen). Dementsprechend treten zwischen den einzelnen Kurven eines solchen Systems nicht nur relativ große Abstände auf (Abb. 7 und 8), sondern auch erhebliche Unterschiede in Steigung, Startwert und maximalem Wert von ε der α-Bande. Dieser Maximalwert liegt im allgemeinen umso niedriger, je höher die zur vollständigen Zerstörung der Reaktion erforderliche Säurekonzentration ist. Weiter ist aus den Abbildungen 7 und 8 ersichtlich, daß die Kurven der einzelnen Chromotrope sich nicht gleichmäßig über den gesamten Konzentrationsbereich verteilen, sondern sich fast ausschließlich in zwei Gruppen anordnen. Im niedrigen Konzentrationsbereich der Säuren findet man die "schwachen" Chromotrope Carboxymethylcellulose, Alginat und Chondroitinsulfat und in den höheren Säurekonzentrationen die "starken" Chromotrope Heparin, Carrageen, SP_{54} sowie Dextransulfat meist sehr eng beieinander liegend.

Die unterschiedliche Steigung der Kurven zeigt, in welchem Konzentrationsbereich jeweils die Entstehung des einwertigen Farbstoff-Kations erfolgt. Vergleicht man hierzu die Kurven der Abbildung 8, in der alle hier untersuchten Polysaccharide in der Resistenz ihrer Metachromasie gegenüber steigender Konzentration Salzsäure dargestellt sind, so zeigt die Kurve von Carboxymethylcellulose den stärksten Anstieg. Die Auslöschung der metachromatischen Reaktion von Carboxymethylcellulose, Alginat und Chondroitinsulfat beginnt zwar bei annähernd gleicher Salzsäurekonzentration, sie ist jedoch für Carboxymethylcellulose bereits bei 1×10^{-3} normal Salzsäure abgeschlossen, während für Alginat 5×10^{-3} normal Salzsäure und für Chondroitinsulfat 4×10^{-2} normal Salzsäure erforderlich ist. Im Gegensatz hierzu differieren die Startkonzentrationen der Kurven von SP_{54} und Dextransulfat zwar um eine ganze Zehnerpotenz, doch ist die Resistenz ihrer metachromatischen

Verbindung mit Azur A gleichzeitig bei 1 normal Salzsäure erschöpft. Dieses spezielle Kurvenverhalten in Gegenwart von SP_{54} und Dextransulfat ist auch bei Toluidinblau zu beobachten. Beide Chromotrope haben zwar nahezu die gleiche Ladungsdichte, jedoch ein stark differierendes Molekulargewicht.

Im Zusammenhang mit diesen allgemeinen Betrachtungen der vorliegenden Befunde soll hier auch auf die Unterschiede eingegangen werden, die durch spezifische spektrale Eigenschaften der beiden verwendeten Farbstoffe aufgrund ihrer Molekülstruktur begründet sind. Toluidinblau unterscheidet sich im Molekülaufbau von Azur A durch eine in Position 3 zusätzlich vorhandene Methylgruppe, die die plane Oberfläche des Gesamtmoleküls vergrößert und somit die Van-der-WAAL'schen Kräfte zwischen eng benachbarten Farbstoff-Molekülen verstärkt. Dieser Unterschied im Farbstoff-Molekül zwischen Azur A und Toluidinblau wirkt sich hier in zweifacher Hinsicht aus:

1. Die metachromatische Reaktion von Toluidinblau besitzt eine geringfügig erhöhte Resistenz gegenüber allen Störfaktoren (Tabelle 3).
2. Toluidinblau besitzt auch schon in der relativ niedrigen Farbstoff-Konzentration von $2,5 \times 10^{-5}$ molar, die allen Untersuchungen hier zugrunde liegt, vor allem in Gegenwart zunehmender Mengen von Fremdionen (Säure) eine stärkere Tendenz zur Dimerisation. Dieser Unterschied zwischen Azur A und Toluidinblau ist schon beim direkten Vergleich der Spektren beider Farbstoffe in rein wässriger Lösung in den entsprechenden Konzentrationen ($2,5 \times 10^{-5}$) erkennbar. Hier liegen die ε-Werte für Toluidinblau bei 48.500 und für Azur A bei 42.800 (Maximalwerte in dünnsten wässrigen Lösungen: Toluidinblau 60.000, Azur A 46.000). Aus diesem

Grunde sind die ε-Werte für Toluidinblau vor allem im Bereich höherer Konzentrationen Störfaktor durch parallel zur Lösung der metachromatischen Bindung laufende Dimerisation stark erniedrigt und erreichen in keinem Fall den ε-Wert von 48.500 für $2,5 \times 10^{-5}$ molares Toluidinblau in wässriger Lösung.

Die Reihenfolge der Metachromotropie

Das Grundprinzip der Substratdifferenzierung im Rahmen des Metachromasie-Tests ist die Objektivierung von Unterschieden in der Stabilität der metachromatischen Bindung verschiedener Chromotrope. Erfolgversprechende Ansatzpunkte für die Aufstellung einer solchen Reihenfolge der Metachromotropie bietet der Vergleich von Störfaktorkonzentration, durch die jeweils eine bestimmte metachromatische Bindung aufgehoben wird. Dies setzt jedoch u.a. das Vorhandensein distinkter Konzentrationsunterschiede voraus, die es auch anderen Untersuchern ermöglichen, das erhaltene Differenzierungsergebnis zumindest qualitativ, wenn möglich quantitativ zu reproduzieren.

Von theoretischem und praktischem Interesse ist in diesem Zusammenhang die Frage, ob die einzelnen metachromatischen Verbindungen gegenüber allen verwendeten Säuren die gleiche relative Stabilität (= Reihenfolge der Metachromotropie) aufweisen. Die hier zur Substratdifferenzierung herangezogenen Säurekonzentrationen entsprechen dem 50%-Wert von ε der α-Bande der Farbstoffe.

Aus der Tabelle 3 ist auf den ersten Blick ersichtlich, daß je nach Störfaktor [2] die erforderlichen Konzentrationen

---

2) Die Beurteilung der Befunde erfolgt in der Tabelle 3 ohne Berücksichtigung der Phosphorsäure, da das Verhalten dieser Säure als Störfaktor in vielen Punkten vom Gesamtbild der Befunde abweicht. Die Phosphorsäure wurde herangezogen, um entsprechend der Citronensäure auch eine dreiwertige anorganische Säure in ihrer Wirkung zu untersuchen. Aus Gründen der besseren Übersicht wurde bei allen quantitativen Vergleichen auf diese Säure verzichtet.

(50%-Wert) mit zunehmender Stärke der metachromatischen Reaktion der Chromotrope zwar unterschiedlich große, jedoch insgesamt prägnante Stufen darstellen. Inwieweit die auftretenden Unterschiede der Störfaktorkonzentrationen zur Differenzierung von verschiedenen Mucopolysacchariden im histologischen Präparat mit Erfolg herangezogen werden können, soll noch diskutiert werden.

Tabelle 3

Anstieg der Säurekonzentrationen (in Normalität), die bei den metachromatischen Verbindungen [3] von Azur A und Toluidinblau zum Ereichen des 50%-Werts von ε (α-Bande) benötigt werden.

[3] Die Abkürzungen bedeuten:
CMC = Na-Carboxymethylcellulose; Alg = Ammonium-Alginat;
Ch-S = Na-Chondroitinsulfat; Carr = λ-Carrageen;
Hep = Heparin-Na; DS = Na-Dextransulfat.

Azur A

	CMC	Alg	Ch-S	Carr	Hep	SP_{54}	DS
HCl	0,000092	0,00036	0,0012	0,028	0,09	0,09	0,44
H_2SO_4	0,000078	0,00029	0,0015	0,042	0,14	0,30	0,83
Oxals.	0,000118	0,00040	0,0110	0,150	0,21	0,53	0,65
Weins.	0,000124	0,00043	0,0045	0,590	1,00	1,38	2,48
Citr.-S.	0,000183	0,00072	0,0350	0,680	1,21	1,41	2,18
Essigs.	0,000350	0,00055	0,0520	1,100	1,46	1,51	3,40

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Toluidinblau

	CMC	Alg	Ch-S	Carr	Hep	SP_{54}	DS
HCl	0,000171	0,00043	0,0032	0,25	0,26	0,34	0,80
H_2SO_4	0,000114	0,00031	0,0024	0,54	0,58	0,65	4,25
Oxals.	0,000239	0,00320	0,0028	0,47	0,48	0,63	1,08
Weins.	0,000197	0,00162	0,0033	1,21	1,78	2,20	3,79
Citr.-S.	0,000500	0,00190	0,0060	1,19	1,39	1,51	2,90
Essigs.	0,000420	0,00360	0,0150	1,20	2,10	2,20	4,40

Die Zahlenwerte in der Tabelle 3 bestätigen eine einheitliche Reihenfolge in der Stärke der metachromatischen Bindung der Chromotrope:

Carboxymethylcellulose < Alginat < Chondroitinsulfat < Carrageen Heparin < SP_{54} < Dextransulfat.

Die hier wirksamen Konzentrationen der Säuren schwanken zwischen dem schwächsten und stärksten Chromotrop um den 5.000 - 50.000-fachen Wert. Für ein bestimmtes Chromotrop beträgt der Konzentrationsunterschied zwischen der stärksten und schwächsten Säure das 2 - 20-fache. Unter den beiden untersuchten Thiazin-Chargen erfordert Toluidinblau insgesamt etwas höhere Säurekonzentrationen als Azur A. Inwieweit die Reihenfolge der Chromotrope in der Resistenz ihrer metachromatischen Bindung unter Berücksichtigung der hierbei wirksamen Gruppen am Polyanion (Carboxyl- bzw. Sulfatgruppen) und der Ladungsdichte (errechnet aus dem Äquivalentgewicht) mit den gängigen Vorstellungen über die Metachromotropie in Einklang zu bringen ist, soll an anderer Stelle besprochen werden.

D I S K U S S I O N

1. Die metachromatische Reaktion (MR)

1.1. Definition des Begriffs "Metachromasie"

Als Entdecker der metachromatischen Reaktion gilt Paul EHRLICH (1875). Doch sollten auch CORNIL, JÜRGENS und HESCHL genannt werden, die diese Erscheinung gleichfalls 1875 mit Methylviolett am Amyloid beobachteten, aber hierfür keinen eigenen Begriff prägten.

Dies geschah kurz darauf durch Paul EHRLICH, der den ursprünglich von ihm als "Reaktionsfarbe" bezeichneten metachromatischen Effekt so definierte, daß "violette und rote Farbstoffe die granulierten Bindegewebszellen in einer von dem angewandten Farbtone abweichenden Nuance färben." Auch wenn zum damaligen Zeitpunkt eine wissenschaftliche Erklärung noch nicht möglich war, wurde damit der Begriff "Metachromasie" eindeutig als substratgebundene Erscheinung definiert. Das Gegenstück zum Begriff "Metachromasie" ist die "Orthochromasie". Sie bezeichnet die Übereinstimmung der Farbe von Färbelösung und gefärbtem Präparat. Auch metachromatische Farbstoffe zeigen Orthochromasie, wenn sie zur Anfärbung von nicht metachromogenen Substanzen benutzt werden.

Nach der etymologischen Definition ("Metachromasie" = "Umfärbung", "Farbwechsel") müßten streng genommen alle Farbänderungen, die ein Farbstoff unter irgendwelchen Bedingungen erfahren kann, unter diesen Begriff eingeordnet werden. Tatsächlich gibt es keine Veränderung im Spektrum eines Farbstoffes, die nicht zu irgendeinem Zeitpunkt als "Metachromasie" bezeichnet wurde. Hieraus resultiert zum erheblichen Teil die Begriffsunsicherheit, durch die sich das umfangreiche Schrifttum über die metachromatische Reaktion (MR) auszeichnet.

Selbst in neueren Veröffentlichungen wird der Metachromasie-Begriff auf verschiedene Fälle von Hypsochromie (Absorption bei kürzeren Wellenlängen) ungeachtet der jeweiligen Entstehungsursache angewendet (vgl. PADDAY, 1970).

Anhand einiger Beispiele sei die Vielfalt der einzelnen Definitionen aufgezeigt:

So liest man bei BOOIJ et al. (1953): "Metachromasie in einem sehr allgemeinen Sinne ist die reversible Verschiebung im Spektrum eines organischen Farbstoffes, die unter dem Einfluß zugesetzter Substanzen auftritt, wobei Veränderungen durch pH-Wechsel oder Lösungsmittel ausgeschlossen werden." Obwohl diese Definition den Vorstellungen der Histologen und Histochemiker weitgehend entspricht (da die sog. "Lösungsmittel-Metachromasie", die "Metachromasie der Farbbase bei stark alkalischen pH-Werten" sowie die "Konzentrations-Metachromasie" ausgeklammert werden), so ist sie doch in einem wesentlichen Punkt zu allgemein gehalten: "Die zugesetzten Substanzen" sollten besser durch den Begriff "Polyanionen" präzisiert werden, da die Definition sonst auch den Bandenwechsel einschließt, der durch Zugabe von Neutralsalz zu erzeugen ist.

Auch die von HARMS (1965) geforderte Formulierung der "reversiblen, ohne Spektralphotometer erkennbaren Verschiebung im sichtbaren Spektrum," hält einer strengen Überprüfung nicht stand, da hier eine Reihe von nachweislich metachromatischen Farbstoffen (z.B. Methylenblau) aufgrund subjektiver Kriterien ausgeschlossen werden und andererseits - so HARMS - "Veränderungen auf der Basis der Micellierung der Farbstoffe" noch als metachromatisch bezeichnet werden. (Gemeint ist die sog. "Konzentrations-Metachromasie". Diese beruht auf einer Aggregation der Farbstoffmoleküle ohne Chromotrop, wenn der Farbstoff hochkonzentriert in wässriger Lö-

sung vorliegt.) - (ZANKER, 1952a; BARTELS, 1956; TOEPFER, 1970c).

Dem tatsächlichen Begriffsinhalt am nächsten kommt wohl folgende Definition, die auf grundlegenden Arbeiten von SYLVEN (1954) sowie SCHEIBE und ZANKER (1958) beruht: "Unter Metachromasie versteht man gemeinhin die Änderung einer Farbe eines Farbstoffes bei der Bindung an tierische oder menschliche Gewebe oder auch an Fasern, Kunststoffen und dergleichen, sowie an bestimmte Substanzen in Lösungen." (SCHAUER und SCHEIBE, 1959).

BERGERON und SINGER (1958) vertreten folgende Auffassung: "Metachromasie ist der charakteristische Farbwechsel einiger Anilin-Farbstoffe, wenn sie an einzelne Substanzen gebunden sind oder wenn sie in der Lösung konzentriert sind."

Diese letzte Definition versuchte PADDAY (1970) zu verbessern, da sie nach seiner Meinung nicht auf alle Bedingungen zutrifft, unter denen Metachromasie auftritt: Metachromasie ist ein charakteristischer, reversibler Farbwechsel, den ein Farbstoff durch die Wirksamkeit einer Veränderung in seiner Umgebung erfahren kann, unter Ausschluß einer chemischen Reaktion des Farbstoffes, ("Metachromasy is a characteristic reversible colour change, that any dye may undergo by virtue of a change in its environment not involving chemical reaction of the dye").

Einen nahezu vollständigen Überblick über die Erscheinungen, auf die der Begriff "Metachromasie" gegenwärtig angewendet wird, findet man bei MANDAL et al. (1969): "Metachromasia with basic dyes may be induced in solution in different ways: a) by increasing the dye concentration (RABINOWITCH and EPSTEIN, 1941; ZANKER, 1952), b) by adding salt to the dye solution (KELLY et al., 1956), c) by decreasing the dielectric constant of the solvent medium

(MCKAY and HILLSON, 1966), and d) by the presence of certain anionic polyelectrolytes, the chromotropes, in the dye solution (MICHAELIS and GRANICK, 1945; LEVINE and SCHUBERT, 1952; SCHUBERT and LEVINE, 1953; PAL and BASU, 1958). Metachromatic colour change is due to the aggregation of the dye molecules (ions) either by themselves or through the compound formation with the poly-anions (MICHAELIS and GRANICK, 1945; MUKERJEE and MYSELS, 1955; PAL and SCHUBERT, 1961a, 1961b)."

Diese Aufstellung wäre vollständig, enthielte sie auch noch die "Metachromasie" der Farbbase, die bei stark alkalischen pH-Werten zustandekommt und seit HANSEN (1905) im Schrifttum immer wieder als Ursache der metachromatischen Reaktion auftaucht.

Die Beispiele zeigen nicht nur, daß man von einer einheitlichen Auffassung über den Begriff "Metachromasie" bisher weit entfernt ist, sie zeigen auch die Schwierigkeit, einen Begriff zu definieren und abzugrenzen, der - im Gegensatz zum eigentlichen Wortinhalt - in der Praxis fast ausschließlich auf die Reaktion einiger Farbstoffgruppen (Akridine, Oxazine, Thiazine, Phenazine) mit sauren Polysacchariden eingeengt wurde, zu deren spezifischem Nachweis sie benutzt wird.

So wird in der vorliegenden Arbeit der Begriff "Metachromasie" ausschließlich auf die gegenseitige Wechselwirkung kationischer Farbstoffe an der Oberfläche anionischer Makromoleküle sowohl am histologischen Schnitt als auch in vitro angewendet. Spektralphotometrisches Kriterium der metachromatischen Reaktion ist dabei das Auftreten der μ-Bande, deren Charakteristik schon oben genau beschrieben wurde.

Metachromatische Farbstoffe

Obwohl theoretisch ein metachromatischer Effekt auch bei anionischen Farbstoffen (z.B. Eosin) denkbar ist, handelt es sich bei den in der Histologie und Histochemie zur Anwendung gekommenen metachromatischen Farbstoffen ausschließlich um kationische Farbstoffe. Betrachtet man die von LISON (1935b) als metachromatisch bezeichneten Farbstoffe (Tabelle 4), so ist unschwer zu erkennen, daß diese Aufstellung vorwiegend

Tabelle 4

Aufstellung der metachromatischen Farbstoffe aus LISON (1935b).

	Color Norm.	Color Métach.
A. Dérivés du triphénylméthane		
Parafuchsine	rouge	rouge jaun.
Fuchsine	rouge	rouge jaun.
Violet d'Hoffmann (Dahlia)	violet	rouge
Violets de méthyle R, 2 R, 4 R	violet	rouge
Bleu d'aniline sol. Alcool.	bleu	violet
Bleu Victoria R	bleu	rouge
Bleu Victoria B	bleu	rouge
Bleu glacier	bleu	violet
Sétocyanine 0	bleu	violet
B. Oxazines		
Violet de erésyl solide	violet	rouge
Bleu de erésyl brillant	bleu	rouge
Oxonine	bleu	rouge
Bleu nouveau B	bleu	rouge
Bleu de Nil	bleu	violet
C. Thiazines		
Thionine (violet de Lauth)	violet	rouge
Bleu de toluidine	bleu	rouge
Azurs de méthylène A, B, C.	bleu	rouge
Bleu de méthylène nouveau	bleu	violet
D. Azines		
Rouge neutre	rouge	jaune
Violet neutre extra	violet	rouge
Safranine T, O	rouge	jaune
Indazine M	bleu	rouge
Bleu Janus	bleu	violet
Vert Janus	vert	bleu-roug.
Héliotrope au tannin	rouge viol.	rouge sang
E. Dérivés de l'acridine		
Rouge d'acridine 3 B	rouge	jaune.

historische Bedeutung besitzt. Sie ist nicht nur unvollständig, sondern enthält auch Farbstoffe, die nach den heutigen Vorstellungen nicht als metachromatisch anzusprechen sind. LISON (1935a) selbst wies nachdrücklich auf die Gefahr eines metachromatischen Irrtums ("erreur métachromatique") hin. Er verstand darunter die Tatsache, daß die metachromatische Verfärbung ("virage métachromatique") der durch pH-Differenzen bewirkten Verfärbung ("virage ionique") oft zum Verwechseln ähnlich ist. Deshalb haben sich metachromatische Farbstoffe, die diesen "Indikatorumschlag" (der nichts mit Metachromasie zu tun hat) im alkalischen Bereich zeigen (z.B. Thiazine) als besonders günstig für pH-Differenzierungen herausgestellt, da im interessierenden Bereich zwischen pH 0 und dem Neutralpunkt eine Farbänderung durch Änderung des Dissoziationszustandes im Gegensatz zur Auffassung von KIESER (1969) auszuschließen ist. So wäre z.B. Neutralrot im speziellen Fall der vorliegenden Untersuchungen nur bedingt geeignet, da sein "Indikatorumschlag" im Bereich von pH 2 liegt, obwohl dieser Farbstoff ansonsten für quantitative, spektralphotometrische Untersuchungen aufgrund seiner ausgezeichneten Metachromasie mit genau zu definierender μ-Bande ähnlich den Thiazinen sehr gut geeignet ist.

Unter den einzelnen Gruppen metachromatischer Farbstoffe, die Bedeutung als histologische Standardpräparate erreichten, sind außer den Akridinfarbstoffen (z.B. Akridinorange) einige Oxazin-Farbstoffe (z.B. Kresylechtviolett, Coelestinblau B, Brilliantkresylblau), Neutralrot sowie hauptsächlich die Thiazin-Farbstoffe (z.B. Azur A, Toluidinblau und in neuester Zeit auch 1:9 Dimethyl-Methylenblau) hervorzuheben.

Über Akridinorange und seine Reaktion mit Heparin liegen bereits ausgezeichnete Arbeiten vor (ZANKER, 1952a und 1952b; SCHEIBE und ZANKER, 1962). Diese stellen gleichzeitig

die ersten exakt quantitativen Untersuchungen auf diesem Gebiet überhaupt dar. Die Akridine und andere Fluorochrome haben z.T. klinische Bedeutung in der Fluoreszenz-Metachromasie bei der Karzinomdiagnose erlangt.

Die Oxazin-Farbstoffe finden aufgrund ihrer visuell gut erkennbaren Metachromasie bereits seit langem Verwendung in der Histologie und werden auch heute häufig in der Pathologie angewandt (z.B. Amyloiddarstellung). Diese Farbstoffe werden jedoch den neuesten Untersuchungen, die in die Theorie der Metachromasie vorstoßen und in diesem Rahmen quantitative Beziehungen erkunden wollen, nicht mehr gerecht, weil hier die Verunreinigung mit einzelnen Homologen so weitgehend ist, daß sie nicht definiert dargestellt werden können. Selbst bei reinen Oxazin-Farbstoffen herrschen zudem Zweifel über die genaue Molekülstruktur.

Die bevorzugte Verwendung der Thiazin-Farbstoffe (insbesondere Azur A und Toluidinblau) im Schrifttum ergibt sich aus der Tatsache, daß hier der metachromatische Farbton besonders stark vom orthochromatischen abweicht. Dies ist jedoch nicht im Sinn einer starren Korrelation zwischen dem visuell sichtbaren Farbwechsel von rot nach blau und der Differenz von α- und μ-Bande zu verstehen (KELLY, 1956). Der Grund dafür liegt in der Physiologie des menschlichen Auges, welches den selben Wellenlängenunterschied in bestimmten Wellenlängenbereichen besonders empfindlich, in anderen Bereichen dagegen kaum registriert. Beispiel hierfür ist Methylenblau, welches spektralphotometrisch eine den Farbstoffen Azur A und Toluidinblau vergleichbare Differenz zwischen orthochromatischer und metachromatischer Bande aufweist. Bei Methylenblau liegen jedoch beide Banden in einem spektralen Bereich, in dem der Unterschied für das menschliche Auge kaum wahrnehmbar ist. Methylenblau wurde deshalb sogar be-

reits von verschiedenen Autoren (HARMS, 1965) als nicht metachromatischer Farbstoff bezeichnet!

So ist für einen optimalen metachromatischen Farbstoff nicht nur eine große Differenz zwischen orthochromatischer und metachromatischer Bande zu fordern, sondern auch, daß beide Banden im empfindlichen Bereich des menschlichen Auges liegen. Diese Bedingung wird jedoch besonders von Azur A, Toluidinblau und 1:9 Dimethyl-Methylenblau erfüllt.

Eine signifikante Eigenschaft guter metachromatischer Farbstoffe ist die Fähigkeit zur Bildung polymerer (tetramerer) Aggregate in gesättigter Lösung in Abwesenheit von Chromotrop (ZANKER, 1952a; TOEPFER, 1968). Darüber hinaus zeigen die Thiazine bei Zugabe von Fremdsubstanzen speziell im Bereich von deren Löslichkeitsgrenze die gleiche Tendenz zur Ausbildung von di- und tetrameren Aggregaten. Diese Eigenschaft steht in unmittelbarem Zusammenhang mit der Eignung dieser Farbstoffe für die metachromatische Reaktion. Bei der Aggregation, d.h. planparallelen Aneinanderlagerung der Moleküle steht die vollkommen ebene Molekülstruktur dieser Farbstoffgruppe als Ursache im Vordergrund. Sie bietet die Voraussetzung für eine Annäherung auf molekulare Abstände und das somit verbundene Überwiegen Van-der-WAAL'scher Attraktionskräfte auch ohne Vorhandensein einer Matrix in Form von Carboxyl-, Phosphat- und Sulfatgruppen mit definiertem Abstand.

Metachromatische Substanzen

Bereits BUNGENBERG DE JONG und TEUNISSEN (1938) war bekannt, daß es sich bei den "verschiedenen negativen Gruppen, die zur Metachromasie führen", um "Carboxyl-, Sulfat- und Phosphat-Kolloide" handelt. Die in diesem Zusammenhang interessierenden biologisch wichtigen Stoffklassen sind Mucopolysaccharide und hochmolekulare native DNS [4]. Die metachromogene Eigenschaft dieser Substrate ist in allen Fällen an das Vorhandensein einer Mindestkonzentration gebunden, was aufgrund der stöchiometrischen Beziehung auch für die verwendeten Farbstoffe gilt (TOEPFER, 1972b).

Allgemein handelt es sich bei den Chromotropen um hochmolekulare Verbindungen, die durch Art und Abstand ihrer sauren Gruppen sowie sterische Faktoren (z.B. Variabilität der Raumstruktur) die Aggregationstendenz metachromatischer Farbstoffe in unterschiedlichem Maß fördern, sobald diese mit dem Makromolekül in Wechselwirkung treten. Die Tatsache, daß die minimale metachromogene Farbstoffkonzentration bei den einzelnen Chromotropen differieren kann, wurde bereits von CASTIGLIONI (1949/50) als Substrat-Differenzierungs-Methode angegeben und auch von einigen weiteren Autoren angewandt (z.B. GRAUMANN und MUSSO, 1959; GRAUMANN, 1961), ohne sich indes als Standard-Methode durchzusetzen.

---

[4] Gegenüber einer heute noch verbreiteten Auffassung ist nur die native, hochmolekulare DNS zu einer echten Metachromasie befähigt. Denaturierte DNS sowie alle bisher untersuchten RNS führen lediglich zur Ausbildung einer γ-Bande. Daraus ist ersichtlich, daß die intakte Doppelhelix der nativen DNS Voraussetzung für die Ausbildung einer echten metachromatischen Reaktion ist (TOEPFER, 1971).

Die spezifischen chemischen Eigenschaften eines bestimmten Chromotrop-Moleküls ergeben sich im wesentlichen aus dem Zusammenspiel folgender Faktoren:

1. Art der sauren Gruppen: "Die Natur der ionogenen Gruppe spielt eine wichtige Rolle bei der Metachromasie" (BANK und BUNGENBERG DE JONG, 1939).
2. Abstand der sauren Gruppen untereinander (Ladungsdichte)
3. Molekulargewicht
4. Raumstruktur sowie Variabilität der Raumstruktur.

Der wesentliche Einfluß der beiden ersten Faktoren wird in den hier vorliegenden Befunden klar dargestellt. Der Einfluß des Molekulargewichts auf die metachromatische Reaktion wird ebenfalls in der Literatur wiederholt betont (LISON, 1935b; HARMS, 1965). HARMS äußert sich hierzu wie folgt: "Je höher das Molekulargewicht, desto ausgesprochener ist das chromotrope Vermögen, ausgedrückt durch den Verdünnungsgrad und die minimale Menge, die noch Metachromasie ergeben."

Es ergibt sich jedoch anhand der vorliegenden Befunde kein Anhaltspunkt dafür, daß das Molekulargewicht einen maßgeblichen Einfluß auf das Ausmaß des metachromatischen Bandenwechsels (= Differenz α-/μ-Bande) bzw. auf die Resistenz der metachromatischen Reaktion gegenüber Störfaktoren besitzt. Hierfür sei besonders auf den Vergleich zwischen den Chromotropen SP_{54} und Dextransulfat hingewiesen, deren Molekulargewicht innerhalb der hier untersuchten Substanzen mit 2.000 bzw. 500.000 die absoluten Grenzwerte darstellt, während jedoch die Ladungsdichte nahezu identisch ist: 3,8 bzw. 4,0 SO_3H-Gruppen pro Disaccharideinheit (TOEPFER, 1972a). Die Hauptursache für den Grad des metachromatischen Bandenwechsels wurde bereits von BANK und BUNGENBERG DE JONG (1939) erkannt: "Die metachromatische Verfärbung ist umso stärker, je ladungsdichter das erregende Kolloid-Anion ist."

Der Abstand der negativen Ladungsplätze an einem Chromotrop muß entweder primär oder aber auch nach Farbstoffzugabe in der Größenordnung der für ein π-Elektronen-Resonanzsystem der Farbstoffmoleküle optimalen Annäherung liegen (im Fall der Thiazine ca. 4 - 6 Å). Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß der effektive Abstand von sauren Gruppen am Chromotrop in Lösung, insbesondere nach Bindung von metachromatischen Farbstoffen, nicht identisch sein kann mit dem Abstand, den diese Gruppen bei fadenförmiger, gestreckter Anordnung der einzelnen Saccharidringe hintereinander besitzen. Dies ist hauptsächlich darauf zurückzuführen, daß der tatsächliche Bindungsplatzabstand stark von der jeweiligen sphärischen Struktur des Makromoleküls abhängt, die vom Zufallsknäuel ("random coil") bis zur Helix reichen kann. Darüber hinaus ist diese sphärische Struktur noch in unterschiedlichem Maß variabel und damit abhängig vom Reaktionsmilieu. Dies gilt besonders, wenn die Chromotrope nicht in feste Gewebsstrukturen eingebaut sind, sondern als Reinsubstanzen einer Lösung von metachromatischen Farbstoffen zugesetzt werden. Es erscheint sehr wahrscheinlich, daß sich dabei die gebundenen Farbstoffmoleküle mit Hilfe Van-der-WAAL'scher Attraktionskräfte selbst optimale Bindungsplatzabstände schaffen, indem sie die sphärische Struktur des Makromoleküls im Rahmen seiner Variabilität verändern. Eine besonders starke Variabilität wird beispielsweise für das Heparin-Molekül angenommen, dessen sphärische Struktur nach neuerer Erkenntnis helikaler Natur ist (Heparin-Modell nach STONE und MOSS, 1967).

4.4. Die Ursachen der metachromatischen Reaktion

Bekanntlich können Thiazin-Farbstoffe in Lösung unter verschiedenen Bedingungen einen roten Farbton annehmen. Diese Möglichkeiten sind:

1. Zugabe von größeren Mengen anorganischer, gut löslicher Salze (BANK et al., 1939; MICHAELIS et al., 1945; MICHAELIS, 1947).
2. Hohe Farbstoffkonzentration (HARMS, 1965; TOEPFER, 1968; TOEPFER, 1970c).
3. Veränderung des pH-Werts in das Alkalische, sodaß schließlich die Farbbase vorliegt (EPSTEIN et al., 1941; ZANKER, 1952a; TOEPFER, 1970c).
4. Zugabe von Polyanionen.

All diese "roten Formen" sind im Schrifttum zu irgendeinem Zeitpunkt zur Erklärung für die Ursache der eigentlichen metachromatischen Reaktion zwischen Thiazinmolekülen und sauren Mucopolysacchariden von verschiedenen Autoren herangezogen worden. So wurde z.B. von HANSEN (1908) der metachromatische Farbton auf die Entstehung der Farbbase durch hydrolytische Spaltung des Farbsalzes zurückgeführt (wobei die Farbbase an bestimmten Gewebsbestandteilen aufgespeichert würde: Farbsalz + Wasser $\rightleftharpoons$ Farbbase + Säure).

Obwohl diese Theorie von HANSEN durch LISON (1935b) anhand eigener Experimente entkräftet wurde (s. unten), wird die Farbbase selbst im neueren Schrifttum noch verschiedentlich als Ursache der Metachromasie betrachtet (KIESER, 1969).

MICHAELIS veröffentlichte in der "Enzyklopädie der mikroskopischen Technik" (1903) eine Theorie, die davon ausging, daß die Metachromasie durch intramolekulare Umlagerungen (Tautomerie) entstehe, doch revidierte er diese Ansicht bereits in der zweiten Auflage der "Enzyklopädie" (1910) durch eine neue Version: "Die rote Form des Thionin ist ein Polyme-

res der blauen." Obwohl sich MICHAELIS hiermit der heutigen Auffassung näherte, gab er diese Theorie in der dritten Auflage der "Enzyklopädie" (1926) wieder auf.

Auch HOLMES (1926) erblickte die Ursache der Metachromasie in einer intramolekularen Umlagerung des Farbstoffs. Seine sog. "Affinitätsumstellungstheorie" erwies sich jedoch als unhaltbar, weil sie die Existenz von fünfwertigem (!) Stickstoff voraussetzt. Ohne allgemeine Anerkennung blieb auch SPEK (1940) mit seinem Begriff der "Fällungsmetachromasie". Er beruht auf der Bildung eines besonderen Komplexes von Farbstoff und Chromotrop, und zwar als Einbau des undissoziierten Farbsalzmoleküls in dehydrierte Kolloidteilchen als Folge von Wasserentzug bei Farbstoffkonzentrierung. Die SPEK'schen Vorstellungen besitzen keine ausreichende Überzeugungskraft, weil eine metachromatische Reaktion als Lösungsmittelentzug bei Farbstoffkonzentrationen von 10^{-4} - 10^{-6} nicht vorstellbar ist, sie werden jedoch von GILLISEN (1953) und WOOHSMANN (1955/56) aufrechterhalten.

Der Beginn der systematischen Erforschung der metachromatischen Reaktion mit chromotropen Reinsubstanzen in vitro ist untrennbar mit dem Namen LISON (1935b) verbunden. Er erklärt den Farbwechsel mit zwei farblich differenten Formen der metachromatischen Farbstoffe (normale Form $\rightleftharpoons$ metachromatische Form), wobei durch Chromotrope das Gleichgewicht nach rechts verschoben würde. [5] Eine Spezifikation der metachromatischen

---

[5] Von LISON stammt auch der Begriff der "negativen Metachromasie" (LISON et al., 1950). Die Bezeichnung erklärt sich aus der langwelligen Bandenverschiebung (grünstichiges Blau), die in Farbstoff-Nucleinsäure-Lösungen von hohem Nucleinsäuregehalt auftritt. Die bei Thiazinen um 14 - 18 nm langwellig verschobene Bande erhält von TOEPFER (1971) die Bezeichnung δ-Bande. Sie tritt bei allen DNS- und RNS-Präparaten auf.

Form erfolgte dabei nicht, doch wurde erstmals auf die Abhängigkeit der metachromatischen Reaktion von Temperatur und Wasserstoffionenkonzentration sowie auf das Ausbleiben der konzentrationsbedingten Farbverschiebung in anderen Lösungsmitteln als Wasser hingewiesen. Seine Auffassung, die Metachromasie stelle eine spezifische Reaktion auf Schwefelsäureester ($R\text{-}OSO_3H$) von hochmolekularen Substanzen dar, wurde bereits durch die Untersuchungen von BANK und BUNGENBERG DE JONG (1939), die auch Phosphat- und Carboxylchromotrope untersuchten, widerlegt. Sie äußerten sich zu den tieferen Ursachen der Metachromasie wie folgt: "In Gegenwart von Makromolekülen tritt Elektroadsorption der positiven Farbstoffionen ein, d.h. die Abstoßungskräfte werden vermindert und die organischen Skelette (= Farbstoff-Kationen) können sich durch Vander-WAAL'sche Kräfte assoziieren." Diese Auffassung wurde später von MICHAELIS und GRANIK (1945) weitgehend bestätigt.

Einen wichtigen Beitrag für die heute gültige Auffassung über den metachromatischen Effekt stellen auch die Untersuchungen von SCHEIBE (1938) sowie SHEPPARD und GEDDES (1944a) dar. Während SCHEIBE spektralphotometrische Studien der Farbstoff-Aggregat(Micell)-Bildung in Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration (α-, β-, γ-Bande) durchführte und in der Entstehung dieser Aggregate die Ursache der Nichtbefolgung des BEER'schen Gesetzes sah, untersuchten SHEPPARD und GEDDES die Farbstoff-Aggregatbildung vorwiegend aus physikochemischer Sicht. Sie brachten den ersten Hinweis auf die planparallele Koppelung der Farbstoff-Kationen im Abstand von ca. 4 Å. Weitere wertvolle Erkenntnisse verdanken wir den Arbeiten von ZANKER (1952a und 1952b), SCHEIBE und ZANKER (1958 und 1962) sowie SYLVEN (1954 und 1957).

Auch wenn diese Untersuchungen des Aggregationsver-

haltens in wässriger Lösung keine eigentlichen Metachromasiestudien darstellen, konnten nur sie elementare Grundlagen für das Verständnis der metachromatischen Reaktion liefern, da die Aggregationstendenz der Farbstoffe in ursächlichem Zusammenhang mit ihrer metachromogenen Eigenschaft steht.

Eine weitere Erklärung für den "Farbwechsel" nach Annäherung der Farbstoff-Ionen auf eine Distanz, die eine Wechselwirkung erlaubt, stammt von SCHUBERT und LEVINE (1955): Unter Zugrundelegung der quantenmechanischen Absorptionstheorie von KUHN (1949) wird der metachromatische Bandenwechsel auf einen Energiesprung zurückgeführt, den bestimmte π-Elektronen dadurch erfahren, daß die am losesten gebundene π-Elektronengarnitur bei der Assoziation beteiligt ist und die einzelnen Elektronen somit nicht mehr als π-Elektronen existieren.

Aus den bisherigen Ausführungen wird deutlich, daß es selbst bei Anwendung des Metachromasie-Begriffs im oben erwähnten engeren Sinn als Reaktion von Thiazinen, Oxazinen und Akridinen mit sauren Polysacchariden schwierig ist, bezüglich der Ursachen eine einwandfreie theoretische Vorstellung zu entwickeln. So stellt auch die heute vorwiegend vertretene Vorstellung über die Metachromasie, die auch der vorliegenden Arbeit zugrunde liegt, letztlich eine Zusammenfassung von Einzelaussagen der oben genannten Autoren dar: Es handelt sich bei der metachromatischen Reaktion um die Aggregation gleichsinnig orientierter Farbstoff-Kationen in wässriger Lösung unter gleichzeitiger Bindung an entgegengesetzt geladene Makromoleküle, deren wirksame Bindungsplatzabstände in der Größenordnung der maximalen Annäherung der Farbstoffmolekel in wässriger Lösung liegen (im Fall der Thiazine ca. 4 - 6 Å). Die Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkung an der Chromotropoberfläche in Form der Ausbildung eines gemeinsamen Resonanzsystems von π-

Elektronen führt zur Absorption bei einer anderen (kürzeren) Wellenlänge als der des monomeren Farbstoff-Kations. Die Aggregation von Farbstoffmolekülen an der Chromotropoberfläche ist im Vergleich zur Aggregation von Farbstoff in rein wässriger Lösung (also in Abwesenheit von Chromotrop) durch folgende Besonderheiten charakterisiert:

1. Die kationischen Ladungen der Farbstoffmolekel sind an der Chromotropoberfläche gleichsinnig orientiert, während in Abwesenheit des polyanionischen Ladungsmusters sich die kationischen Zentren entgegengesetzt gegenüber liegen, sowohl beim dimeren als auch beim tetrameren Zustand (LEWIS et al., 1943; SHEPPARD et al., 1944b; ZANKER, 1952a; TOEPFER, 1968 und 1970c).
2. Die Größe von Farbstoff-Aggregaten an Makromolekülen ist nicht auf den tetrameren Zustand begrenzt wie bei hohen Farbstoffkonzentrationen in wässrigen Lösungen (ZANKER, 1952a; TOEPFER, 1968 und 1970c).
3. Durch die Matrizenfunktion des Chromotrops tritt die Farbstoffaggregation bereits bei erheblich niedrigeren Farbstoffkonzentrationen ein.
4. Die Aggregation an der Chromotropoberfläche führt zu einem Bandenwechsel (α/μ), die Farbstoff-Aggregation bei zunehmender Konzentration dagegen zu einer kontinuierlichen, gleichfalls hypsochromen Bandenverschiebung von der Wellenlänge der dimeren(β)-Bande zur γ-Bande. (Über die strenge Unterscheidung zwischen den Begriffen der μ- und γ-Bande und den Zuständen, die diesen spektralen Erscheinungen zugrunde liegen: TOEPFER, 1970c; HARMS, 1965.)

Nach der heute vorherrschenden Auffassung ist die metachromatische Bindung durch das gleichzeitige Auftreten folgender Kräfte charakterisiert:

a) Ionenanziehungskräfte: elektrostatisch, weitreichend ("long

range"), vorwiegend verantwortlich für die Farbstoff-Chromotrop-Bindung, da sie zwischen entgegengesetzten Ladungen auftritt.

b) Dispersionskräfte: anziehend, von kurzer Reichweite ("short range"). Sie sind im wesentlichen für die Farbstoff-Farbstoff-Bindung verantwortlich. Allgemeine Bezeichnung: Van-der-WAAL'sche Kräfte, im speziellen Fall der π- π-Elektronenübergänge (Überlappung der π-Systeme) auch HEITLER-LONDON'sche Kräfte genannt.

c) COULOMB'sche Kräfte: abstoßend, da zwischen gleichnamigen Ladungen - also auch einwertigen Farbstoff-Kationen - auftretend.

Für die metachromatische Bindung gilt, daß die Dispersionskräfte gegenüber den COULOMB'schen Kräften überwiegen.

4.5. Die metachromatische Reaktion am histologischen Präparat und in vitro

Die weitaus größte Zahl der Veröffentlichungen über die Metachromasie befaßt sich mit deren Auftreten am histologische Präparat. Dementsprechend lag ihre ursprüngliche Bedeutung in erster Linie auf dem Gebiet der histologischen Differentialdiagnostik durch selektive Anfärbung bestimmter Zellen und Gewebsstrukturen. Erst die zunehmende Bedeutung der Histochemie führte dazu, sich mit dem molekularen Äquivalent des metachromatischen Effekts im Hinblick auf eine Substratdifferenzierung zu befassen. Eine Voraussetzung hierfür ist die Untersuchung der Metachromasie an Reinsubstanzen in vitro. Die wichtigsten Unterschiede zwischen Untersuchungen am histologischen Präparat und in vitro sind:

a) Bei Untersuchungen von Reinsubstanzen in vitro sind Art und Menge sowie Molekulargewicht des chromotropen Materials genau bekannt. Im Gegensatz dazu sind am histologischen Präparat bisher nur qualitative Aussagen unter starker subjektiver Beeinflussung durch den Betrachter möglich (z.B. + bis ++++ für entsprechend starke Metachromasie).

b) Ein negativer Ausfall der Metachromasie kann am histologischen Präparat auch dann eintreten, wenn Mucopolysaccharide in ausreichender Menge vorhanden sind, weil Eiweißkörper einen Inhibitoreffekt auf die Reaktion ausüben können (KELLY, 1951; KRAMER und WINDRUM, 1955). Einerseits können ihre kationischen Zentren mit den Farbstoff-Kationen um die anionischen Stellen des Chromotrops konkurrieren, andererseits besteht die Möglichkeit, daß die anionischen Gruppen des Chromotrops rein räumlich durch Proteine blockiert sind, d.h. am histologischen Schnitt ist dem Farbstoff nur ein Teil aller vorhandenen anionischen Gruppen zugänglich.

c) Das Ergebnis von Färbungen histologischer Schnitte kann selbst bei Einheitlichkeit von Farbstoffen und Untersuchungsgut durch unterschiedliche histologische Technik (Fixationstechnik, Fixationszeit, Einbettungsmaterial, insbesondere aber durch Alkohol) erheblich beeinflußt werden. In vitro spielen dagegen Färbezeiten, Reihenfolge der Störfaktorzugabe sowie die eben genannten Faktoren naturgemäß keine Rolle.

d) Das biologische Schnittmaterial enthält bereits selbst Elektrolyte, die einen zusätzlichen unkontrollierbaren Einfluß auf die metachromatische Reaktion, insbesondere bei quantitativen Untersuchungen ausüben können.

e) Am histologischen Schnitt werden immer verschiedene Chromotrope gleichzeitig dargestellt. In vitro können dagegen die einzelnen sauren Polysaccharide isoliert in ihrer metachromatischen Reaktion mit den einzelnen Farbstoffen untersucht werden. Hier gewinnt man überhaupt erst physikalisch-chemische Daten der Metachromasie selbst, wie z.B. Höhe und Lage der Absorptionsmaxima einzelner Banden. Solche Untersuchungsergebnisse sind als Grundlage für jede weitere experimentelle Untersuchung, sei es im Reagenzglas oder auch am histologischen Präparat mit den heute möglichen exakten Methoden der Mikrospektrophotometrie unbedingte Voraussetzung!

f) Die Messung des Anstiegs der α-Bande kann nur in vitro als Maß für die Zerstörung der Metachromasie herangezogen werden, während mikrospektrophotometrisch nur der Abfall der μ-Bande zu verwertbaren Ergebnissen führt.

4.6. Die Resistenz der metachromatischen Reaktion

Die Differenzierung einzelner Mucopolysaccharide auf der Grundlage der Resistenz ihrer metachromatischen Verbindung mit Thiazin-Farbstoffen ist als histochemisches Standardverfahren bereits von zahlreichen Autoren in verschiedenen Modifikationen durchgeführt worden. Vereinzelt wurde dabei auch versucht, die unterschiedliche Resistenz der metachromatischen Reaktion zur Unterscheidung von Carboxyl-, Sulfat- und verschiedentlich auch Phosphatgruppen zu nutzen. Manchmal wurde dabei sogar eine noch weitgehende Differenzierung innerhalb einer bestimmten Gruppe von Chromotropen (z.B. Polysulfate) angestrebt (GRAUMANN et al., 1966; ARNOLD, 1966).

Als Verfahren zur histotopochemischen Differenzierung der Mucopolysaccharide hat der Metachromasie-Test bis heute die größte Verbreitung erfahren. Als gemeinsames Prinzip liegt den in der Literatur angegebenen Modifikationen dieses Tests fast ausschließlich eine steigende Konzentration folgender Störfaktoren zugrunde:

1. Anorganische Salze (z.B. BANK et al., 1939; LANDSMEER, 1951; BOOIJ et al., 1953; GRAUMANN, 1961; GRAUMANN et al., 1966; PRAS und SCHUBERT, 1969; TOEPFER, 1970c, 1972a und 1972b).
2. Alkohol (z.B. SYLVEN, 1941 und 1945; KRAMER und WINDRUM, 1955; TOEPFER, 1970b und 1970c; VARUTE und NANAWARE, 1972).
3. Lösungsmittel mit unterschiedlicher Dielektrizitätskonstante (z.B. EDLUND und PERSSON, 1949; MCKAY und HILLSON, 1966 und 1967; VARUTE und NANAWARE, 1972).
4. pH-Werte (Puffer und Säure) (z.B. CASTIGLIONI, 1947a und 1947b; ROMANINI, 1951; LANDSMEER und DEMPSEY, 1949; LANDSMEER, 1951; GRAUMANN und MUSSO, 1959;

GRAUMANN et al., 1966; ARNOLD, 1966; SCHMITZ-MOORMANN, 1968b; TOEPFER, 1970b, 1970c und 1972a).

Darüber hinaus wurde von verschiedenen Autoren die minimale metachromogene Farbstoffkonzentration zur Differenzierung von Mucopolysacchariden eingesetzt (CASTIGLIONI, 1949/50; GRAUMANN und MUSSO, 1959; GRAUMANN, 1961).

4.7. Die Problematik der Vergleichbarkeit der speziellen Befunde im Schrifttum

Trotz einer Vielzahl von Veröffentlichungen über die Metachromasie ist bis heute lediglich die steigende Resistenz der metachromatischen Reaktion von Carboxyl-, Phosphat- und Sulfatgruppen (in der genannten Reihenfolge) allgemein anerkannt. Weitergehende Differenzierungsversuche lieferten bisher keine verwertbaren Ergebnisse, da eine direkte Vergleichbarkeit der Befunde nicht gegeben ist. In der Mehrzahl der Fälle wurden die Befunde am histologischen Schnitt erhoben und unterlagen damit allen Fehlermöglichkeiten der subjektiven Betrachtungsweise. Im Verlauf der hier vorliegenden Untersuchungen konnte wiederholt die Erfahrung gemacht werden, daß es selbst bei Verwendung von Reinsubstanzen, also unter wesentlich günstigeren Voraussetzungen als am histologischen Präparat, nahezu unmöglich ist, die Metachromasie qualitativ oder gar quantitativ mit bloßem Auge zu beurteilen. Bei den einzelnen histologischen Befunden ist immer zu berücksichtigen, daß die unterschiedliche histologische Technik die Ergebnisse erheblich beeinflussen muß. Dabei ist insbesondere an Unterschiede im Untersuchungsgut, in den Färbezeiten und Farbstoffkonzentrationen sowie in den Fixationsmethoden zu denken. Gerade die Fixation von sauren Mucopolysacchariden wirft dabei eine eigene Problematik auf. Mit Recht weist SZIRMAI (1963) darauf hin, daß jeder Versuch, diese Substanzen möglichst quantitativ und ortsgetreu zu fixieren, nur mit einer gleichzeitigen definitiven Blockade der sauren Gruppen möglich ist. Gerade dieser Schritt jedoch würde die Mucopolysaccharide jeder spezifischen Nachweismethode entziehen.

Die bisher verwendeten industriellen Farbstoffe differieren in ihrem Farbstoffgehalt sowie in der Qualität ihrer Verunreinigungen erheblich (HOROBIN, 1969 und 1970; TOEPFER,

1969 und 1970c). Selbst bei einem annähernd gleich großen Verunreinigungsgrad von Farbstoffen unterschiedlicher Provenienz ist noch nichts über die Qualität dieser Verunreinigung ausgesagt und damit ihr störender Einfluß nicht kalkulierbar. Auch von SYLVEN (1957) wurde vermutet, daß Mißerfolge, die beim Metachromasie-Test selbst dann noch auftreten, wenn nach einem standardisierten Verfahren vorgegangen wurde, in erster Linie auf die Eigenart des Farbstoffs zurückzuführen sind.

An konkreten Beispielen bestimmter industrieller Farbstoff-Chargen zeigten GRAUMANN und MUSSO (1959), daß 1%-ige wässrige Lösungen von Azur A und Toluidinblau je nach Hersteller z.T. beträchtliche pH-Differenzen aufwiesen (pH 3,84 - 6,62). Selbst bei 0,01%-igen Lösungen differierten die gemessenen pH-Werte noch um bis zu 1,77 Einheiten. Auf den ursächlichen Zusammenhang zwischen den pH-Änderungen und dem Grad der Verunreinigung der Farbstoffe wurde von diesen Autoren bereits hingewiesen. Dies führte zu der Vermutung, daß Ergebnisse, die mit verschiedenen Farbstoff-Qualitäten erhalten werden, nahezu unmöglich miteinander zu vergleichen sind. Durch Messung der pH-Werte von kommerziellen Thiazin-Farbstoffen in wässriger Lösung sowie deren qualitativ-quantitative Einzelanalyse wurde hierfür von CLEMENS und TOEPFER (1968b) der quantitative Beweis erbracht.

Es erscheint zunächst naheliegend, die Problematik dieser unterschiedlichen pH-Werte von Farbstoffen in wässriger Lösung durch den Einsatz von Pufferlösungen zu umgehen. Durch die Verwendung unterschiedlicher Farbstoff-Qualitäten erfolgt jedoch eine Belastung der Pufferkapazität in teilweise beträchtlichem Ausmaß. Abbildung 9 (aus CLEMENS und TOEPFER, 1968c) zeigt, inwieweit sich ein durch Michaelis-

Puffer eingestellter pH-Wert durch Zugabe von 0,1% kommerziellen Thiazin-Farbstoff-Pulvern ändert. Azur B und Thionin stellen dabei lediglich die Grenzwerte für die von beiden Autoren untersuchten Thiazin-Chargen dar. Alle anderen Vertreter dieser Farbstoffgruppe liegen zwischen beiden eingezeichneten Kurven.

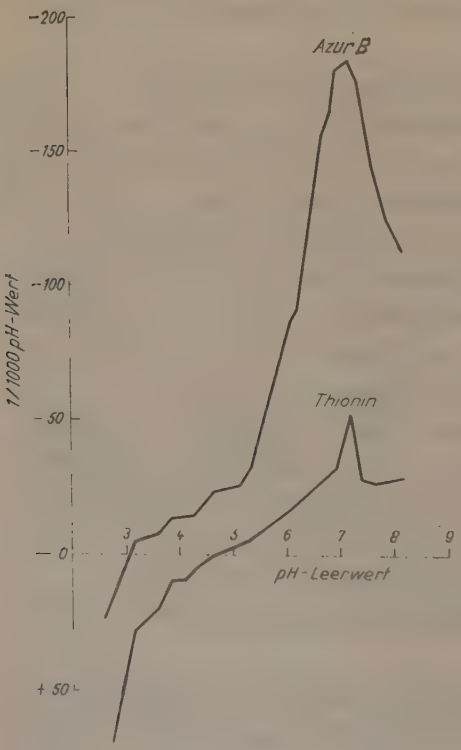


Abb. 9. Michaelis-Puffer: Abweichungsbereich vom pH-Leerwert nach Zugabe von 0,1% kommerziellem Thiazin-Farbstoff-Pulver (aus CLEMENS und TOEPFER, 1968c).

Aus Abb. 9 ist ersichtlich, daß nach Farbstoffzugabe in ein eingestelltes Puffersystem nur im Breich von pH 3 - 5 eine

annähernde Konstanz des pH-Wertes gewährleistet ist. Auf diese Weise wird von den Autoren eindrucksvoll dargestellt, inwieweit die bisher in ihrem Ausmaß völlig unbekannte Wirkung der Farbstoffverunreinigung sogar pH-Werte beeinflußt, die durch Puffer eingestellt wurden. Neben dieser Belastung der Pufferkapazität ist jedoch noch ein weiterer Faktor zu berücksichtigen: Wird im Rahmen eines Metachromasie-Tests der substratdifferenzierende Einfluß des pH-Werts mit Hilfe von Pufferlösungen untersucht, so wird die gewünschte Aciditätswirkung von einer zusätzlichen (unerwünschten) "Salzwirkung" der Puffersubstanzen überlagert (GRAUMANN, 1961; MEHLER und TOEPFER, 1971).

Obwohl alle Autoren, die die Unterdrückung der metachromatischen Reaktion zu einem bestimmten pH-Wert in Relation setzen, letztlich unterstellen, daß eine reine Hydronium-Ionen-Wirkung vorliegt, wurde die Wirkung der Puffersubstanzen in den seltensten Fällen kritisch beleuchtet. Da jedoch die Puffersubstanzen ebenso wie alle anderen Salze eine zusätzliche Wirkung auf die metachromatische Reaktion entfalten, sollte der aktuelle pH-Wert ausschließlich durch reine Säure eingestellt werden. Dennoch wird vereinzelt behauptet, daß es für die Reaktion gleichgültig ist, ob eine bestimmte Wasserstoffionen-Konzentration durch Puffer oder durch reine Säure zustande kommt. (BALAZS und SZIRMAI, 1958a; ARNOLD, 1966: "Es besteht grundsätzlich ein gleiches Auslöschungs-pH bei McIlvain-Puffer, HCl, Essigsäure und Borsäure.") Die Arbeiten, in denen der pH-Wert durch Zugabe von reiner Säure als Störfaktor eingestellt wurde (meist HCl), sind jedoch in der Aussagekraft ihrer Ergebnisse entweder durch eins der bereits genannten Kriterien, zumindest aber durch den geringen Umfang der Versuchsserien eingeschränkt (STENRAM, 1953; BALAZS und SZIRMAI, 1958; SZIRMAI und BALAZS, 1958; ARNOLD, 1966; KAWAMOTO et al., 1969).

Aus den hier zitierten Gründen wird einwandfrei erkennbar, daß die bisherigen Befunde aus der Literatur über den Einfluß des pH-Wertes weder eine exakte Vergleichbarkeit noch Reproduzierbarkeit erwarten lassen.

Der Einfluß der Wasserstoffionen-Konzentration auf die metachromatische Reaktion

Bereits BANK und BUNGENBERG DE JONG (1939) waren der Ansicht, daß die sog. Biokolloide durch Wasserstoffionen entionisiert werden, wobei es zu einer Abnahme der Ladungsdichte an Makromolekülen kommen soll. Eine der ersten Veröffentlichungen über die Verwendung unterschiedlicher pH-Werte zur Differenzierung von Mucopolysacchariden stammt von CASTIGLIONI (1947a). Hier wurden die Präparate bei pH 2,2 bzw. 7,0 mit Toluidinblau gefärbt und dann in fünfminütigen Intervallen durch farbstoffreien Puffer geführt.

Nach der bisherigen Meinung beruht die Wirkung der Wasserstoffionen darauf, daß mit ihrer steigenden Konzentration die Dissoziation der sauren Gruppen am Polyanion zunehmend zurückgedrängt wird. So ist nach LANDSMEER (1951) bei der elektrostatischen Natur der Substrat-Farbstoff-Bindung ein Einfluß der Wasserstoffionen-Konzentration von vornherein zu erwarten, und auch WALTON und RICKETTS (1954) sind der Ansicht, daß der aktuelle Dissoziationszustand des Substrats bei gegebener Dissoziationskonstante eine Funktion der Wasserstoffionen-Konzentration im Lösungsmittel ist. Nach GRAUMANN (1961) hängt die Metachromotropie u.a. von der Dissoziationskonstanten der betreffenden Säureradikale des Substrats ab (Carboxyl-, Phosphat- und Sulfatgruppen).

Die im Schrifttum überwiegende Form der pH-Differenzierung erfolgt auf morphologischer Grundlage, d.h. es wird der pH-Wert bestimmt, bei dem sich bestimmte Strukturen gerade noch metachromatisch anfärben lassen (z.B. GRAUMANN, 1961; GRAUMANN et al., 1966). Sucht man jedoch nach Veröffentlichungen, die exakte Angaben über den pH-Wert enthalten, bei dem eine Neutralisation bestimmter saurer Gruppen

am Chromotrop erfolgt, so findet man nur wenige Autoren, die diesbezüglich zu verbindlichen Aussagen kommen. Nach BOOIJ et al. (1953) dürften Carboxylgruppen unter pH 3,0 nicht mehr in dissoziiertem Zustand vorliegen. LANDSMEER und GIEL (1956) vermuten diesen Grenz-pH-Wert bei 3,4, während STONE et al. (1967) die Auffassung vertreten, daß bei pH 3,1 80% und erst bei pH 2,4 100% aller Carboxylgruppen im undissoziierten Zustand vorliegen. Die wesentlich stabilere metachromatische Reaktion von Chondroitinsulfat wird dagegen von SYLVEN (1954) mit 0,04 m Phosphatpuffer bei pH 5,9 (!), also nahezu im neutralen Bereich, unterdrückt. Vergleichsweise hierzu nennen GRAUMANN et al. (1966) den niedrigsten Extremwert der Metachromotropie für (heparinhaltige) Mastzellen mit pH 1,2. Diese deutlich differenten Angaben zeigen, daß unter verschiedenen Versuchsbedingungen im Einzelfall auch zwangsläufig verschiedene Ergebnisse erhalten werden, was im Fall des Grenz-pH-Wertes für den metachromatischen Effekt besonders deutlich zum Ausdruck kommt. Es war also erforderlich, mit einer umfassenden, systematischen Untersuchung die metachromatische Reaktion verschiedener Farbstoffe mit einer größeren Anzahl chromotroper Substanzen in ihrer Resistenz gegenüber mehreren anorganischen und organischen Säuren in vitro zu untersuchen.

Die hier vorgelegten Befunde wurden mit Farbstoffen von hohem Reinheitsgrad und definierten chromotropen Substanzen isoliert von allen störenden und unkontrollierbaren Einflüssen erhoben, um die Wirkung von anorganischen und organischen Säuren auf die metachromatische Reaktion zu überprüfen. Von besonderer Bedeutung ist dabei das völlige Fehlen einer orthochromatischen Bindung des Farbstoffs an andere Substanzen als an Mucopolysaccharide, wie sie am histologischen Präparat unver-

meidlich ist, da die spektrale Untersuchung der Reaktion, wie bereits begründet, nur anhand der α-Bande exakt möglich ist. Für alle hier verwendeten Störfaktoren ergibt sich bei beiden Farbstoffen (Azur A und Toluidinblau) eine absolut einheitliche Reihenfolge der Chromotrope nach der Stärke ihrer metachromatischen Reaktion: Carboxymethylcellulose < Alginat < Chondroitinsulfat < Carrageen < Heparin < SP_{54} < Dextransulfat.

Unter Berücksichtigung der wirksamen Gruppen am Polyanion (Carboxyl- bzw. Sulfatgruppen) und der aus dem Äquivalentgewicht zu bestimmenden Ladungsdichte entspricht dieser Befund vollständig den bisherigen Erkenntnissen über die Metachromotropie. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Metachromotropie eine "dimensionslose Größe" darstellt (GRAUMANN, 1961), in die verschiedene Substrateigenschaften qualitativ und quantitativ in solch komplexer Weise eingehen, daß die Metachromotropie eines bestimmten Substrats empirisch bestimmt werden muß, da der Mechanismus der Reaktion, zumindest aber das Wirkungsprinzip der Störfaktorwirkung bis heute noch nicht aufgeklärt ist.

So erfolgte in der vorliegenden Untersuchung die Anwendung einer größeren Anzahl von Störfaktoren vor allem mit der Absicht, über die Aufstellung einer einfachen Reihenfolge der Metachromotropie hinaus zu Aufschlüssen über das Wirkungsprinzip zu gelangen, das der Aufhebung der metachromatischen Reaktion zugrunde liegt.

4.9. Die Wirkung der anorganischen und organischen Säuren als Störfaktor

Von einem optimalen Störfaktor für einen Metachromasi Test wären möglichst große und möglichst gleichmäßige Konzen trationsunterschiede zwischen den einzelnen Chromotropen zu fordern. Um den individuellen Einfluß der sieben untersuchten Säuren auf die metachromatische Reaktion einer bestimmten Farbstoff-Chromotrop-Verbindung unmittelbar vergleichen zu können, wurde in den Abbildungen 34 - 47 jeweils ein Farbstoff-Chromotrop-Gemisch sämtlichen sieben Säuren gegenüber gestellt (s. auch Abb. 5 und 6). Eine vergleichende Betrachtu dieser Abbildungen führt zur Feststellung, daß es schwierig is hinsichtlich der Störfaktorwirkung zu einer einheitlichen Aussage - etwa im Sinn einer generell gültigen Reihenfolge der W kungsintensität - zu gelangen. Die Ursachen hierfür sind bei eingehender Beurteilung der Abbildungen 34 - 47 zu erkennen:

1. Die Abstände der Kurven sind in den einzelnen Systemen ve gleichsweise gering, weil sich die zur Entstehung des mono meren Farbstoff-Kations benötigten Konzentrationen bei alle organischen und anorganischen Säuren gleichermaßen im Bereich einer Zehnerpotenz bewegen. Damit unterscheiden sie sich in ihrer Wirkung als Störfaktoren weit weniger, als es die erheblichen Unterschiede in der Wirkungsintensität diese Säuren bei klassischen chemischen Reaktionen erwarten lassen.
2. In verschiedenen Fällen erreichen die Kurven nach anfänglich individuellem Verlauf einen gemeinsamen Endpunkt. Vielfach existieren sogar gemeinsame Schnittpunkte von meh reren Säuren (z.B. Weinsäure, Citronensäure und Essigsäu re).

3. Die Säuren besitzen nicht gegenüber allen Farbstoff-Chromotrop- Gemischen die gleiche relative Intensität der Störfaktorwirkung (s. Tabelle 5).

Tabelle 5

Reihenfolge der Störfaktorwirkung in Abhängigkeit von Farbstoff und Chromotrop beim 50%-Wert.

Azur A

CMC	H_2SO_4	HCl	Weins.	Oxals.	Citrs.	Essigs.
Alg	H_2SO_4	HCl	Weins.	Oxals.	Citrs.	Essigs.
Ch-S	H_2SO_4	HCl	Weins.	Oxals.	Citrs.	Essigs.
Carr	HCl	H_2SO_4	Oxals.	Weins.	Citrs.	Essigs.
Hep	HCl	H_2SO_4	Oxals.	Weins.	Citrs.	Essigs.
SP_{54}	HCl	H_2SO_4	Oxals.	Weins.	Citrs.	Essigs.
DS	HCl	Oxals.	H_2SO_4	Citrs.	Weins.	Essigs.

Toluidinblau

CMC	H_2SO_4	HCl	Weins.	Oxals.	Citrs.	Essigs.
Alg	H_2SO_4	HCl	Weins.	Oxals.	Citrs.	Essigs.
Ch-S	H_2SO_4	HCl	Weins.	Oxals.	Citrs.	Essigs.
Carr	HCl	Oxals.	H_2SO_4	Citrs.	Weins.	Essigs.
Hep	HCl	Oxals.	H_2SO_4	Citrs.	Weins.	Essigs.
SP_{54}	HCl	Oxals.	H_2SO_4	Citrs.	Weins.	Essigs.
DS	HCl	Oxals.	H_2SO_4	Citrs.	Weins.	Essigs.

Aus dieser Aufstellung ergibt sich bei einem qualitativen Vergleich (ohne Berücksichtigung individueller Konzentrationsunterschiede), daß die anorganischen Säuren HCl und H_2SO_4 die Metachromasie stärker beeinflussen als die organischen Säuren Oxalsäure, Weinsäure, Citronensäure und Essigsäure.

Schwefelsäure weist dabei gegenüber der metachromatischen Reaktion von Carboxylgruppen und HCl gegenüber derjenigen von Sulfatgruppen die größere Effektivität auf. Weit schwieriger ist das Verhalten von Oxalsäure zu beurteilen, welche einmal eine stärkere Störfaktorwirkung als Schwefelsäure besitzt (gegenüber der metachromatischen Verbindung von Azur A und Dextransulfat sowie Toluidinblau und allen vier Polysulfaten), zum anderen aber gegenüber der Metachromasie von Carboxylgruppen eine ausgesprochen schwache Wirkung zeigt, die noch unter der von Weinsäure liegt.

Beim Vergleich von Azur A und Toluidinblau werden - besonders am Beispiel von Oxalsäure, Schwefelsäure, Citronensäure und Weinsäure - farbstoffspezifische Unterschiede in der Störfaktorwirkung offenkundig, die jedoch nicht überbewertet werden sollten, da oft nur sehr geringfügige Konzentrationsdifferenzen für die jeweilige Reihenfolge der Säuren verantwortlich sind.

An dieser Stelle muß auch das ungewöhnliche Verhalten der Phosphorsäure erwähnt werden, welche in der Tabelle 5 aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht berücksichtigt wurde. Phosphorsäure zeigt gegenüber einzelnen Mucopolysacchariden (Chondroitinsulfat, Alginat, mit einigen Einschränkungen auch Heparin und Carrageen) eine mit Citronen- und Essigsäure vergleichbare Wirkung, erfordert jedoch gegenüber den Polysulfaten die höchsten Konzentrationen überhaupt. Es stellt sich die Frage, ob dies auf den geringen Dissoziationsgrad der Phosphorsäure in hohen Konzentrationen zurückzuführen ist: Bereits bei einem pH-Wert von 6 liegt die Säure fast ausschließlich in der ersten Dissoziationsstufe vor (94%), während die zweite Dissoziationsstufe fast völlig zurückgedrängt ist (6%). Da dieser pH-Wert von 6 jedoch mit allen untersuchten Säuren beim 100%-Wert erheblich unterschritten wird, darf man davon ausgehen,

daß bei Phosphorsäure im Bereich der Zerstörung der metachromatischen Reaktion nur die erste Dissoziationsstufe für die aktuelle Wasserstoffionen-Konzentration verantwortlich ist. Daraus ergibt sich, daß die Wertigkeit dieser Säure - ähnlich wie auch bei Weinsäure und Citronensäure - zumindest für die Zerstörung der metachromatischen Reaktion von Polysulfaten keine Relevanz besitzen kann, im Gegensatz zu den mehrwertigen anorganischen Salzen. Hier zeigt sich eine strenge Abhängigkeit der Wirkungsintensität von der Wertigkeit (BOOIJ et al., 1953; MEHLER und TOEPFER, 1971).

Auch die im Vergleich zu HCl stärkere Störfaktorwirkung von H_2SO_4 gegenüber den Carboxyl-Chromotropen (Carboxymethylcellulose und Alginat) ist nicht, wie man zunächst annehmen könnte, dadurch bedingt, daß etwa durch eine zusätzliche Dissoziation in zweiter Stufe höhere H^+-Konzentrationen wirksam sind als bei HCl. Selbst wenn die zweite Dissoziationsstufe von H_2SO_4 die gleiche Menge Wasserstoffionen abdissoziieren würde wie die erste, könnte die Acidität aufgrund der Konzentrationsberechnung nach Normalitäten nicht größer sein als bei HCl. Somit ist viel wahrscheinlicher, daß der ungewöhnlich starke Einfluß der Schwefelsäure auf die metachromatische Reaktion von Carboxyl-Chromotropen mit dem Sulfatrest dieser Säure in Zusammenhang steht. Darauf weisen auch die Ergebnisse von Versuchen mit entsprechenden anorganischen Salzen (MEHLER und TOEPFER, 1971) hin, die eine besonders empfindliche Reaktion der Carboxylgruppen gegenüber Sulfatsalzen erkennen lassen.

4.10. Acidität und Störfaktorwirkung

Nach den bisherigen Ausführungen ist zwar ein Zusammenhang zwischen der Säurestärke (Acidität) und ihrer Wirkung als Störfaktor zu vermuten, doch weisen verschiedene Kriterien darauf hin, daß hier keine gesetzmäßigen Beziehungen bestehen. Allein die Tatsache, daß die Säuren bei den einzelnen Farbstoff-Chromotrop-Gemischen keine identische Reihenfolge in ihrer Stärke als Störfaktor zeigen, bestätigt, daß außer den Hydronium-Ionen noch weitere Faktoren einen Einfluß auf die metachromatische Reaktion ausüben.

Ein quantitatives Maß für die Beurteilung dieser zusätzlichen Faktoren bietet der Vergleich der effektiven Störfaktorwirkung mit der Säurestärke, gemessen an der Acidität. Diese Stärke einer Säure wird im wesentlichen durch ihre Dissoziationskonstante K_s bzw. deren negativen Logarithmus, den pK_s-Wert, charakterisiert. Er stellt ein quantitatives Maß für die Hydronium-Ionen dar, die eine Säure bei einer bestimmten Konzentration abdissoziiert. Aus der Abbildung 10 sind die pK_s-Werte der verschiedenen verwendeten Säuren ersichtlich. Danach ist ein hoher pK_s-Wert (größer als ca. +3) charakteristisch für eine schwache Säure, ein niedriger pK_s-Wert (0 - 3) charakteristisch für eine mittelstarke Säure, während starke Säuren ausschließlich einen negativen pK_s-Wert aufweisen.

Aus Abbildung 10 ist deutlich zu erkennen, daß HCl (pK_s = -6) gegenüber H_2SO_4 (pK_s = -3) bei gleicher Normalität mehr freie H^+-Ionen besitzt, also im Sinn der Acidität als stärkere Säure zu gelten hat. Hinsichtlich der Störfaktorwirkung kann dieser Zusammenhang jedoch nicht bestätigt werden. Der Tabelle 5 ist zu entnehmen, daß eine schwächere Säure in bestimmten Fällen eine stärkere Störfaktorwirkung

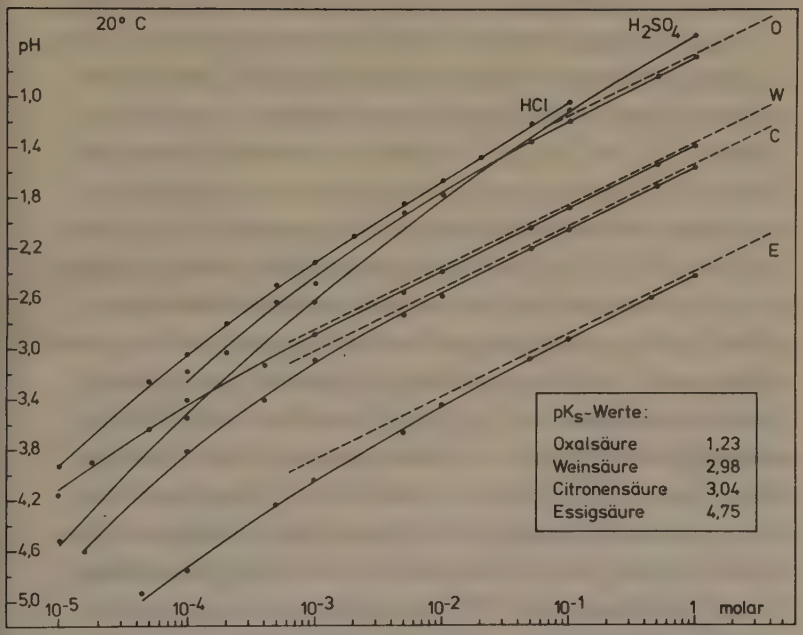


Abb. 10. pH-Werte in Abhängigkeit von der Konzentration verschiedener Störfaktoren sowie deren pK_s-Werte (durchgezogene Linien = gemessene pH-Werte; unterbrochene Linien = errechnete pH-Werte).

ausüben kann. Da jedoch im Schrifttum überwiegend das Hydronium-Ion (also der pH-Wert) für die Störfaktorwirkung verantwortlich gemacht wird, ist es wesentlich, diesen Befund durch Messung des aktuellen, d.h. tatsächlichen pH-Wertes zu ergänzen. Von besonderem Interesse ist dabei außerdem der Einfluß verschiedener Chromotrope und Farbstoffe auf den pH-Wert der Meßlösung.

Die Messungen wurden in einem Konzentrationsbereich von 0,00005 - 1,0 molar Säure durchgeführt. Die Kurvendarstellungen in Abbildung 10 zeigen die acidimetrisch erhaltenen pH-Werte sämtlicher Säuren außer Phosphorsäure für den angegebenen Konzentrationsbereich sowie deren pK_s-Wert. Im einzelnen wurde der pH-Wert von reiner Säure, von Säure + Farbstoff und von Säure + Farbstoff + Chromotrop gemessen. Weder durch Zugabe von Farbstoff allein noch durch Zugabe des metachromatischen Komplexes zur jeweiligen Säure treten signifikante pH-Wert-Verschiebungen gegenüber dem Vergleichswert in reiner Säure auf (gemessene pH-Differenzen nicht größer als 0,01 pH). Aus diesem Grund wurden alle drei Meßreihen durch jeweils eine einzige gemeinsame Kurve dargestellt. Im Gegensatz zu den durch Zugabe von Farbstoff in demineralisiertes Wasser von einer sehr geringen Leitfähigkeit (kleiner als 2 μS) auftretenden pH-Wert-Änderungen ist hier eine relative Konstanz des Säuregrades vorhanden. Offensichtlich ändert der Farbstoff nur in einer weitgehend ionenfreien Umgebung den pH-Wert der Lösung, d.h. er liegt nur dann voll dissoziiert vor, wenn die Gesamt-Ionenstärke der Lösung sehr gering ist.

Für die organischen Säuren ist zusätzlich noch der theoretische, aus dem pK_s-Wert errechnete pH-Wert zum Vergleich eingetragen (unterbrochene Linie). Er errechnet sich aus der Gleichung:

$$pH = \frac{\log pK_s - \log c}{2}$$

Zwar sollte die Gültigkeit dieser Gleichung auf stärkere Konzentrationen schwacher Säuren, d.h. oberhalb 0,1 molar beschränkt sein, doch ist aus den vorliegenden Meßwerten zu

ersehen, daß in der Praxis für Wein- und Citronensäure eine Übereinstimmung zwischen den theoretischen und gemessenen pH-Werten noch bis in den Konzentrationsbereich von 10^{-2} erhalten bleibt. Es werden also in den hier angesetzten metachromatischen Lösungen durch Zugabe von organischen Säuren im höheren Konzentrationsbereich die anhand des pK_s-Wertes errechneten Idealwerte nahezu erreicht.

Bestimmt man für jede Säure, die jeweils zum Erreichen eines bestimmten pH-Wertes (Ordinate) erforderlichen Säurekonzentrationen (Abszisse), dann ergibt sich, geordnet nach zunehmender Konzentration, folgende Reihenfolge der Säuren: HCl, H_2SO_4, Oxalsäure, Weinsäure, Citronensäure, Essigsäure. Diese ungefähre Übereinstimmung der gemessenen Wasserstoffionen-Konzentrationen mit der durchschnittlichen Reihenfolge nach der Stärke der Säuren als Störfaktor läßt zunächst vermuten, daß es sich - wie bisher behauptet wurde - bei der Säurewirkung ausschließlich um die Wirkung des Hydronium-Ions in Form einer Zurückdrängung der Dissoziation der Carboxyl- und Sulfatgruppen am Polyanion handelt. In diesem Fall müßte jedoch die Lösung bei Zerstörung der metachromatischen Reaktion eines bestimmten Farbstoff-Chromotrop-Gemisches ohne Rücksicht auf die Art der verwendeten Säuren einen charakteristischen pH-Wert aufweisen, d.h. es wären für die Konzentration der einzelnen Säuren beim 100%-Wert in diesem Fall vergleichbare pH-Werte entsprechend der Abbildung zu erwarten.

Geht man nun z.B. davon aus, daß für die Zerstörung der Metachromasie von Azur A und Dextransulfat eine HCl-Konzentration von 1 molar erforderlich ist und legt man für 1 molare, starke Mineralsäuren einen pH-Wert von 0,5 zugrunde, so zeigt sich, daß vergleichbare H^+-Ionen-Konzentrationen weder mit Essigsäure noch mit Wein- und Citronen-

säure erreichbar sind. Diese theoretisch erforderlichen Konzentrationen würden die Normalität für reine Essigsäure (17,5 molar) und für die löslichkeitsbedingten Höchstkonzentrationen von Wein- und Citronensäure (10 bzw. 12 normal) weit überschreiten. Den hier dargestellten Befunden ist jedoch zu entnehmen, daß für diese drei organischen Säuren vergleichsweise geringe Konzentrationen im Bereich von 4 - 4,25 normal ausreichen, um selbst einen so stabilen metachromatischen Komplex wie Azur A und Dextransulfat zu zerstören.

Die metachromatische Reaktion von Azur A mit Carboxymethylcellulose wird durch 0,001 molare HCl zerstört. Der gemessene pH-Wert beträgt hierfür 2,34. Dieser Wert wird durch Essigsäure erst bei einer Molarität von 1,0 erreicht. Zur Zerstörung der genannten metachromatischen Reaktion reicht jedoch die Konzentration von 0,005 molar Essigsäure aus. Geht man andererseits von einem bestimmten "Auslöschungs-pH" aus (z.B. pH 3) und liest die dazu erforderlichen Säurekonzentrationen ab, so ergibt sich hierfür bei HCl die Molarität 10^{-4}, für Essigsäure dagegen die Molarität 1. Solche Konzentrationsunterschiede in der Größenordnung von vier Zehnerpotenzen zwischen den einzelnen Säuren treten jedoch weder bei der Aufhebung der metachromatischen Reaktion noch beim 50%-Wert auf. Tatsächlich liegt der Bereich zwischen beginnender und vollständiger Zerstörung der Metachromasie bei den meisten Chromotropen - besonders den Polysulfaten - innerhalb einer einzigen Zehnerpotenz der Störfaktorkonzentration (vgl. Abbildung 8). Demnach ist auch die effektive Wirkung von H_2SO_4, besonders aber der organischen Säuren, ungleich stärker, als dies aufgrund ihres Dissoziationsgrades, d.h. der tatsächlich abgegebenen H^+-Ionen, zu erwarten wäre. Stellt man mit Hilfe der Abbildung 10 die pH-Werte, bei denen die

metachromatische Reaktion von Azur A mit den Chromotropen Carboxymethylcellulose, Chondroitinsulfat und SP_{54} unterdrückt wird, gegenüber, so ergibt sich für die einzelnen Säuren der Befund, daß innerhalb eines bestimmten metachromatischen Systems bei Verwendung unterschiedlicher Hydronium-Ionen-Konzentrationen eintritt (Tabelle 6).

Tabelle 6

pH-Werte bei vollständig zerstörter Metachromasie von Azur A mit Carboxymethylcellulose, Chondroitinsulfat und SP_{54} bei verschiedenen Säuren.

	Carboxymethyl-cellulose	Chondroitin-sulfat	SP_{54}
HCl	2, 32	1, 3	0, 5
H_2SO_4	3, 10	1, 5	0, 55
Oxalsäure	2, 66	1, 15	0, 7
Weinsäure	2, 85	2, 0	1, 3
Citronensäure	3, 2	1, 95	1, 6
Essigsäure	3, 64	2, 65	2, 2

Hier ergibt sich ein eindeutiger Widerspruch zu der Theorie eines konstanten "Auslöschungs-pH" für die metachromatische Reaktion (ARNOLD, 1966). Verschiedene pH-Werte beim Auslöschpunkt müssen jedoch zu der Vermutung führen, daß neben den H^+-Ionen noch weitere Faktoren an der Zerstörung der metachromatischen Reaktion beteiligt sind, und zwar in umso stärkerem Ausmaß, je geringer die tatsächliche Hydroniumionen-Konzentration beim 100%-Wert ist. So müßten insbesondere für die Wirkung der schwachen organischen Säuren (schwach im Sinne der Acidität) Weinsäure, Citronensäure und Essigsäure zusätzliche Faktoren vorhanden sein.

Einer dieser Faktoren ist mit großer Wahrscheinlichkeit in der Wirkung des Säureanions zu sehen. Diese kommt besonders deutlich am Beispiel des Sulfat-Anions zum Ausdruck. Schwefelsäure weist gegenüber Azur A/Carboxymethylcellulose als metachromatischer Verbindung zwar die stärkste Wirkung auf, erreicht diese Wirkung aber mit weit geringeren Wasserstoffionen-Konzentrationen als HCl, Oxalsäure und sogar Weinsäure. Ebenso geht aus Tabelle 6 hervor, daß das Chlorid-Ion der Salzsäure offensichtlich die geringste Wirkung von allen hier untersuchten Anionen zeigt (siehe auch MEHLER und TOEPFER, 1971: Wirkung des Chlorid-Anions bei anorganischen Salzen), so daß die Störfaktorwirkung der Salzsäure nahezu vollständig auf die Wirkung der Hydroniumionen-Konzentration zurückgeführt werden kann.

In Untersuchungen mit Neutralsalzen gelangt ARNOLD (1966) einerseits zwar auch zu der Ansicht, daß Anionen eine geringe Wirkung auf die metachromatische Reaktion ausüben, er spricht jedoch in der gleichen Arbeit den Säure-Anionen eine derartige Wirkung ab, indem er behauptet, daß es gleichgültig sei, mit welcher Säure der "Auslöschungs-pH"-Wert eingestellt wird.

In diesem Zusammenhang sei nochmals auf die Feststellung von SYLVEN (1954) hingewiesen, daß die Metachromasie von Azur A und Chondroitinsulfat mit 0,04 molarem Phosphatpuffer bei pH 5,9 (also fast im neutralen Bereich) unterdrückt wird. Dies spricht eindeutig gegen eine ausschlaggebende Wirkung der H^+-Ionen dieses Puffers, da sich in sämtlichen hier untersuchten Systemen die metachromatische Reaktion gegenüber einem pH-Wert von 5,9 als resistent erweist. Im obengenannten Fall von Azur A und Chondroitinsulfat war bei den eigenen Versuchen die Metachromasie erst in einem pH-

Bereich von 1,15 - 2,65 (je nach Art der verwendeten Säure) zerstört.

Setzt man voraus, daß HCl in ihrer Einwirkung auf die metachromatische Reaktion von den hier untersuchten Säuren als einzige in grober Annäherung mit der Wirkung des Wasserstoffions gleichgesetzt werden kann, und unterstellt dabei, daß beim sog. 50%-Wert (s.o.) von einer gerade noch sichtbar vorhandenen Metachromasie gesprochen werden kann, dann ergibt sich für das empfindlichste aller untersuchten metachromatischen Systeme: Azur A / Carboxymethylcellulose der Befund, daß dieser Komplex und somit auch alle anderen metachromatischen Verbindungen gegenüber pH-Werten > 3,1 resistent sind. Der absolute Grenz-pH-Wert für die Zerstörung der Metachromasie von Azur A / Carboxymethylcellulose liegt bei pH 2,34. Dies bedeutet jedoch, daß oberhalb des Grenz-pH-Wertes von 2,34 noch ein Teil der sauren Gruppen dieses reinen Carboxyl-Chromotrops dissoziiert sein muß, weil ein undissoziiertes Polyanion mit ziemlicher Sicherheit keinen Farbstoff mehr anlagern kann, da eine Entionisierung gleichbedeutend mit dem Verlust der Matrizenfunktion des Chromotrops wäre.

Ein Vergleich mit den eingangs zitierten pH-Werten für die völlige Entionisierung der Carboxylgruppen zeigt, daß lediglich STONE et al. (1967) mit einer pH-Angabe von 2,4 zur Übereinstimmung mit den hier vorliegenden Befunden kommen, während die entsprechenden Vorstellungen aller anderen Autoren bei bedeutend alkalischeren Werten liegen. Für das Sulfatchromotrop SP_{54} ergibt sich ein 50%-Wert von pH 1,1, während bei völliger Zerstörung der Metachromasie dieses Chromotrops mit Azur A durch HCl ein pH-Wert von 0,5 gemessen wurde. Wird nun die metachromatische Reaktion eines beliebigen, hier untersuchten Farbstoff-Chromotrop-Gemisches durch bestimmte Säuren in Gegenwart geringerer Hydroniumionen-

Konzentrationen (also höherer pH-Werte) als dem oben angegebenen Grenz-pH von 2,34 für die empfindlichste der untersuchten metachromatischen Verbindungen (Azur A/Carboxymethylcellulose) völlig zerstört, so ist anzunehmen, daß hier eine reine Aciditätswirkung nicht mehr vorliegen kann. Dasselbe gilt für die Auslöschung der Metachromasie der beiden Sulfatchromotrope SP_{54} und Dextransulfat mit Azur A bei pH-Werten über 0,5. Auch hier müssen oberhalb dieses Grenzwertes noch dissoziierte Gruppen am Chromotrop vorhanden sein, weil sonst keine Farbstoff-Bindung im Sinne der Metachromasie möglich wäre. Da jedoch eine Inaktivierung der anionischen Gruppen des Makromoleküls nur durch die Hydroniumionen der zugegebenen Säuren möglich ist, nicht jedoch durch die gleichgeladenen Säure-Anionen, erscheint es denkbar, daß die metachromatische Reaktion durch Säuren prinzipiell auch dann aufgehoben werden kann, wenn die sauren Gruppen am Chromotrop noch dissoziiert sind[6]. Das würde jedoch bedeuten, daß die Störfaktorwirkung der Säure in diesem Fall primär auf einer Störung der Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkung an der Chromotropoberfläche beruht und weniger auf einem Verlust der Matrizenfunktion des Makromoleküls durch Zurückdrängung der Dissoziation. Hierfür spricht auch die Tatsache, daß bei Verwendung von hochgereinigten Farbstoffen für Toluidinblau etwas höhere Störfaktor-Konzentrationen erforderlich sind als für Azur A[7], was gut mit der unterschiedlichen Stär-

---

6) Diese Grenz-pH-Werte gelten in jedem Fall auch für Toluidinblau, da hier die jeweilige Säurekonzentration und damit auch die effektive H^+-Konzentration sogar geringfügig höher anzusetzen ist als für Azur A.

7) Der sich hier ergebende Unterschied zu den Befunden von TOEPFER (1972a), wo für Azur A gegenüber Toluidinblau eine deutlich stärkere Resistenz der metachromatischen Reaktion festgestellt werden konnte, erklärt sich aus der Tatsache, daß diese Befunde mit einer wesentlich unreineren Charge von Toluidinblau (62% Farbstoffgehalt) erhoben wurden, während für die hier vorgelegten Befunde ein Farbstoff mit 93% Farbstoffgehalt zur Verfügung stand.

ke der gegenseitigen Wechselwirkung der Farbstoffmolekel erklärt werden kann. Toluidinblau besitzt gegenüber Azur A eine zusätzliche Methylgruppe und damit eine nicht unerhebliche Verstärkung der Van-der WAAL'schen Kräfte.

Versucht man, in den soeben abgesteckten Rahmen die Wirkung des H^+-Ions einzuordnen, so scheint zwar die Annahme berechtigt, daß es einen theoretischen Grenz-pH-Wert gibt, bei dem allein aufgrund der wirksamen Wasserstoffionen-Konzentration keine dissoziierten sauren Gruppen am Chromotrop mehr existieren können. Praktisch ist dieser Wert jedoch mit Säuren höchstens näherungsweise erreichbar, weil die zusätzliche, individuell unterschiedliche Wirkung des jeweiligen Säure-Anions sowie weiterer Faktoren berücksichtigt werden muß. Dies führt dazu, daß das π-Elektronen-Resonanzsystem mit großer Wahrscheinlichkeit schon vor dem Erreichen der kritischen H^+-Konzentrationen, die für eine elektrostatische Inaktivierung des Polyanions benötigt wird, zusammenbricht. Damit wäre die Zerstörung der metachromatischen Reaktion nicht grundsätzlich gleichbedeutend mit einer Verdrängung des Farbstoffs vom anionischen Bindungsplatz.

Eine Säurewirkung im Sinn einer primären Störung der Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkung am Chromotrop würde auch die Tatsache leichter erklären, daß sich die Reihenfolge der Störfaktorzugabe in vitro als bedeutungslos erwiesen hat (TOEPFER, 1972a). Es ergeben sich die gleichen Meßwerte, wenn statt einer nachträglichen Säurezugabe zum fertigen metachromatischen Komplex die Säure bereits der Chromotrop-Lösung oder dem Farbstoff zugesetzt wird und danach die Einzelkomponenten zusammengegeben werden. Dazu ergibt sich, daß bei unterschiedlicher Reihenfolge des Zusammengebens der drei Komponenten keine grundsätzlich verschiedenen Vorgänge in der Lösung ablaufen können. Nach den hier erhaltenen Be-

funden ist eine Störfaktorwirkung im Sinn einer generellen Änderung des Milieus wahrscheinlich, in dem sich die metachromatische Reaktion abspielt, und zwar in Abhängigkeit von Qualität und Quantität des Störfaktors. Entweder gestattet das Reaktionsmilieu die Ausbildung eines Resonanzsystems an der Chromotropoberfläche oder nicht. Dies würde jedoch in letzter Konsequenz bedeuten, daß für den Einfluß aller Störfaktoren ein gemeinsames Grundprinzip besteht, trotz aller Unterschiede im Einzelfall. Diese Vermutung wird zum ersten Mal von TOEPFER (1972a) ausgesprochen. Hier wird die metachromatische Reaktion von Heparin und Toluidinblau durch den Einsatz von HCl bzw. NaCl bei annähernd gleichen Konzentrationen zerstört. Aufgrund der uneinheitlichen Vorstellungen über die Theorie der metachromatischen Reaktion sowie der Störfaktorwirkung war die Bedeutung der Reihenfolge von Störfaktor- und Farbstoffzugabe noch in jüngster Zeit Diskussionsgegenstand (TOEPFER, 1972a).

In den bisherigen Ausführungen wurde versucht, den Mechanismus der Auslöschung der Metachromasie als einen komplexen Vorgang zu betrachten, an dem verschiedene Faktoren in individuell wechselndem Ausmaß beteiligt sind. Mit Hilfe der vorliegenden Befunde konnte diese Ansicht weitgehend bestätigt werden. Trotzdem gehen immer noch die meisten Autoren von der bisherigen Annahme aus, daß für die Auslöschung der Metachromasie bestimmter saurer Gruppen am Chromotrop jeweils ein präzise definierter pH-Wert erforderlich ist. Unterstellt man, daß diese Auffassung richtig ist, so dürfte es einmal keine Rolle spielen, ob dieser pH-Wert durch Zugabe reiner Säure oder durch ein Puffersystem erreicht wird, oder auch zum andern bei reinen Säuren, welche Säure jeweils Verwendung findet (BALAZS et al., 1958; ARNOLD, 1966).

Außerdem müßte sich bei gleichzeitiger Zugabe verschiedener Störfaktoren (Säure + Salz) die Wirkung addieren, was jedoch nicht der Fall ist. Gibt man zu einer metachromatischen Lösung, die bereits einen bestimmten Störfaktor in Höhe des 50%-Wertes enthält, den 50%-Wert eines zweiten Störfaktors, so tritt keine vollständige Zerstörung der Metachromasie ein.

Nach der Theorie der Zurückdrängung der Dissoziation der sauren Gruppen am Mucopolysaccharid wäre u.a. zu fordern, daß die metachromatische Reaktion in einem definierten, eng umschriebenen H^+-Ionen-Konzentrationsbereich im Sinn eines Titrationsendpunktes zerstört wird. Alle hier vorgestellten eigenen Befunde zeigen jedoch eine allmähliche, kontinuierliche Zerstörung der metachromatischen Reaktion bei laufender Zunahme der Säurekonzentrationen, teilweise über vier Zehnerpotenzen der Normalität. Es besteht also bei der Unterdrückung der Reaktion auch eine individuelle Abhängigkeit zur steigenden Quantität der einzelnen Säure. Dabei sind außer den H^+-Ionen auch - wie bereits erwähnt - die Anionen der Säuren sowie der undissoziierte Säureanteil wirksam.

Weinsäure, Citronensäure und Essigsäure zeigen in niedrigen Konzentrationen, insbesondere gegenüber den schwächeren Chromotropen, ein differentes Verhalten. Hier entstehen deutliche Unterschiede im Beginn des Kurvenanstiegs, die durchaus in Einklang zu bringen wären mit den jeweiligen pK_s-Werten; außerdem erstreckt sich die Wirkung dieser Säuren gegenüber schwachen Chromotropen über einen größeren Konzentrationsbereich. In den höheren Konzentrationen - im wesentlichen gegenüber stärkeren Chromotropen - erfolgt dagegen nach anfangs unterschiedlichem Anstieg der Kurven die Zerstörung der metachromatischen Reaktion in einem sehr engen Konzentrationsbereich dieser drei Säuren, wobei nahezu kein Unterschied zwischen ihnen zu erkennen ist. Hier liegen auch

die Störfaktor-Endkonzentrationen für die metachromatische Verbindung von Dextransulfat mit Azur A im Bereich von 4,0 - 4,25 normal und mit Toluidinblau im Bereich von 4,75 - 5,0 normal [8]. Wie aus Abbildung 10 zu entnehmen ist, besteht jedoch bei diesen annähernd gleichen Endkonzentrationen (Wein-, Citronen- und Essigsäure) eine Differenz des aktuellen pH-Wertes in der Größenordnung von 1,5 - 1,8 Einheiten. Dies weist darauf hin, daß das Verhalten von Weinsäure, Citronensäure und Essigsäure als Störfaktor im Bereich hoher Konzentrationen nicht mehr maßgeblich von der jeweiligen Wasserstoffionen-Konzentration bestimmt wird. Es weicht hier die anfänglich noch qualitative Säurewirkung mit zunehmendem Kurvenanstieg einer fast völligen Abhängigkeit von der Menge gelöster Teilchen eines bestimmten Störfaktors, wobei offensichtlich gerade auch der große Anteil an undissoziierten Säuremolekeln in irgendeiner Form wirksam ist. Diese zunehmende Kongruenz der am Anfang der Meßreihe noch erheblich differenten Wirkung der drei Säuren gegenüber der metachromatischen Reaktion von Polysulfaten weist ziemlich deutlich auf eine Komponente des Störmechanismus hin, die mit einer Änderung der Lösungsmittel-Charakteristik zusammenhängt. Anders wäre auch die Wirkung undissoziierter Säuremolekel auf die metachromatische Reaktion kaum zu erklären. Bei Normalitäten von 4 - 6 bestehen praktisch 20 - 25 Vol.% des Gesamtvolumens der Lösung aus reiner Säure.

---

8) Gleiche Störfaktorkonzentrationen bei der Zerstörung einer bestimmten metachromatischen Reaktion sind jedoch nicht nur zwischen Wein-, Citronen- und Essigsäure zu beobachten, sondern auch interessanterweise zwischen bestimmten Säuren und anorganischen Salzen. So wird die Metachromasie von Azur A und Heparin gleichermaßen durch 0,35 n HCl, NH_4Cl und KCl zerstört. Entsprechend wird auch die metachromatische Reaktion von Toluidinblau und SP_{54} durch gleiche 1,5 normale Konzentration von HCl bzw. CH_3COONa ausgelöscht.

4.11. Die Bedeutung des Lösungsmittels (H_2O) für die metachromatische Reaktion

Bereits seit HANSEN (1908) wird das Auftreten des metachromatischen Effekts mit den spezifischen Eigenschaften des Wassers ursächlich in Zusammenhang gebracht. Dies läßt sich aus physikalisch-chemischer Sicht wie folgt erklären: Durch die Dipolnatur der Wassermolekel werden die COULOMB'schen Kräfte zwischen den kationischen Zentren der an das Chromotrop angelagerten Farbstoffmoleküle größtenteils abgeschirmt, sodaß die Anziehung aufgrund Van-der-WAAL'scher Kräfte überwiegt, was eine wesentliche Voraussetzung für die Annäherung auf molekulare Abstände bedeutet.

Dieser Sachverhalt wurde, obwohl er bereits seit langem bekannt ist, bei der Diskussion der Störfaktorwirkung entweder übergangen oder zu wenig berücksichtigt. Wenn eine spektrale Erscheinung wie die metachromatische Reaktion so eng an die spezifischen physiko-chemischen Eigenschaften eines Lösungsmittels gebunden ist, daß sie nur in diesem auftritt, dann ist es nicht erstaunlich, daß bereits eine relativ geringe Änderung bestimmter physikalischer Konstanten genügt, um die metachromatische Reaktion entweder zu beeinträchtigen oder zu verhindern. Dies ist beispielsweise schon denkbar, wenn durch Zugabe von Störfaktor der Anteil von nicht polar orientierten Wassermolekülen durch die Hydratation der Kationen und Anionen des Störfaktors in der Lösung verringert wird.

Am Beispiel der Schwefelsäure konnte bereits gezeigt werden, daß auch Anionen einen Einfluß auf die Reaktion haben. Das Sulfat-Anion zeichnet sich durch einen hohen Bedarf an Hydratationswasser aus. Ein Störfaktor braucht somit nicht notwendigerweise die metachromatische Verbindung selbst anzu-

greifen, beispielsweise durch kompetitive Verdrängung des Farbstoffes vom Chromotrop. Es genügt schon, wenn durch die Störfaktorzugabe die Ausbildung eines gemeinsamen π-Elektronensystems an der Chromotropoberfläche von vornherein verhindert oder nachträglich gestört wird. Inwieweit sich durch Störfaktorzugabe die Lösungsmittel-Charakteristik ändert, läßt sich beispielsweise spektralphotometrisch durch Änderung der Bandenlage und Bandenintensität des Farbstoffmonomers objektivieren. Bei den organischen Säuren Weinsäure, Citronensäure und Essigsäure waren solche Änderungen der Lösungsmittel-Charakteristik bereits im Verlauf der ersten Meßreihen zu vermuten, da nach anfänglich normalem Verlauf der Kurven für ε hier ein zusätzliches Phänomen auftrat. Im Gegensatz zu HCl, H_2SO_4 und H_3PO_4 (die in hohen Konzentrationen die Ausbildung einer γ-Bande begünstigen und damit einen weiteren Anstieg der α-Bande verhindern [9]) ergab sich hier nach Erreichen des 100%-Wertes durch weitere Erhöhung der Störfaktor-Konzentration eine kontinuierliche Fortsetzung des Anstiegs der monomeren Bande. Dieser weitere Anstieg hat nichts mehr mit einer weiteren Zerstörung der Metachromasie zu tun, da die Extinktionswerte (bzw. die errechneten ε-Werte) nicht nur die entsprechenden 100%-Werte, sondern auch den Extinktionskoeffizienten des Monomeren von Azur A und Toluidinblau in wässriger Lösung erheblich überschreiten. Dies gilt sowohl für den Extinktionskoeffizienten der hier verwendeten Farbstoffkonzentration von $2,5 \times 10^{-5}$ ($\varepsilon_{\text{Azur A}}$: 42800; $\varepsilon_{\text{Toluidinblau}}$: 48.500) als auch in dünnster wässriger Lösung ($\varepsilon_{\text{Azur A}}$: 46.000; $\varepsilon_{\text{Toluidinblau}}$: 60.000), wo die Werte für die α-Bande aufgrund der fehlenden Dimerisation höher liegen.

---

9) Dies erinnert an das Verhalten von Neutralsalzen, die in hohen Konzentrationen ebenfalls die Ausbildung einer γ-Bande auf Kosten der α-Bande bewirken (MEHLER und TOEPFER, 1971).

Während in Gegenwart von Carboxyl-Chromotropen die 100%-Werte von Azur A noch etwa im Bereich des Leerwertes von Farbstoff in dünnster wässriger Lösung (ε = 46.000) zu finden sind, liegen sie in Anwesenheit von Polysulfaten sogar erheblich unter dem ε-Wert für Farbstoff der Konzentration $2,5 \times 10^{-5}$ (ε = 42.800). Bei Toluidinblau liegen alle 100%-Werte unter 48.500, dem ε-Wert des Farbstoffes der hier verwendeten Konzentration ($2,5 \times 10^{-5}$).

Es ist bekannt, daß Fremdionen, ohne mit dem Farbstoff zu reagieren, dessen Spektrum im sichtbaren Licht und UV im Sinn einer Banden-Depression beeinflussen. Dies sollte grundsätzlich auch für den Einfluß, den das Chromotrop als Makromolekül sowie die verwendeten Störfaktoren auf die Höhe der Extinktionswerte ausüben, gelten.

Um die Höhe der α-Bande von Azur A und Toluidinblau ohne den Einfluß von Störfaktor bei vollständig ausgelöschter Metachromasie beurteilen zu können, kann man die einzelnen metachromatischen Verbindungen durch Einwirkung von Hitze zerstören (LISON, 1935b; KELLY et al., 1969). Die in gemeinsamen, bisher unveröffentlichten Untersuchungen mit TOEPFER und MEHLER erhaltenen Ergebnisse sind in der Tabelle 7 zusammengefaßt.

Die Zahlenwerte in Tabelle 7 bestätigen, daß schon die Anwesenheit von Chromotrop einen signifikanten Einfluß auf die Höhe der α-Bande bei vollständig unterdrückter Metachromasie auszuüben vermag. Hier liegen in Abwesenheit von Störfaktor die bei Zerstörung der Metachromasie durch Hitze ($95^{\circ}C$) erreichbaren ε-Werte nur gringfügig höher als in Gegenwart von Säuren. Der bandendämpfende Einfluß des Chromotrops, insbesondere der Sulfatchromotrope, ist somit weit größer als der des Störfaktors.

Tabelle 7

Höhe von ε der α-Bande nach Zerstörung der metachromatischen Verbindung von Azur A und Toluidinblau durch Temperaturerhöhung ($95^{\circ}C$).

	Azur A	Toluidinblau
Leerwert	49.800	60.760
Carboxymethylcellulose	49.600	55.200
Ammoniumalginat	48.000	48.000
Chondroitinsulfat	50.000	48.600
Carrageen	37.200	36.000
Heparin	38.200	37.300
SP_{54}	36.400	34.000
Dextransulfat	32.400	35.600

Angesichts dieser Bandendepression durch Fremdmoleküle- bzw. Ionen ist es bemerkenswert, daß bei einem Teil der hier in ihrer Wirkung untersuchten Säuren (Essig-, Wein- und Citronensäure) nach vollständiger Zerstörung der metachromatischen Reaktion innerhalb eines relativ geringen Konzentrationsbereiches ein sehr starker Anstieg des Extinktionswertes erfolgte, der weit über dem Wert von Farbstoff der Konzentration $2,5 \times 10^{-5}$ in wässriger Lösung hinausgeht. Bei Oxalsäure, die schon hinsichtlich der Störfaktorwirkung mehr den anorganischen Säuren vergleichbar ist, blieb dieser Bandenanstieg aus. Es kann somit nicht von einem generellen Verhalten der organischen Säuren ausgegangen werden, auch wenn die Erhöhung der Bandenintensität hier ausschließlich bei organischen Säuren auftritt.

Es wurde bereits mehrfach festgestellt, daß in bestimmten Lösungsmitteln unter Ausschluß von Dimerisation und ähnlichen

Erscheinungen die Banden des Monomeren im sichtbaren Bereich bedeutend intensiver sind im Vergleich zu den Absorptionsmaxima in wässrigen Lösungen unter gleichen Bedingungen. Dieser Befund ist in besonderem Ausmaß in äthanolischen Lösungen erhoben worden (z.B. ZANKER, 1952b; KRAMER und WINDRUM, 1955; PESTEMER-BRÜCK, 1955; SCHEIBE und ZANKER, 1958; SCHMITZ-MOORMANN, 1969b; TOEPFER, 1970c).

Da in den höheren Konzentrationen von Weinsäure, Citronensäure und Essigsäure die Meßlösungen mit und ohne Chromotrop schon visuell einen leichten Grünstich aufwiesen, wie er auch in Äthanol aufgrund des völligen Fehlens kurzwellig absorbierender dimerer und polymerer Farbstoffaggregate sowie insgesamt wesentlich schmalerer Absorptionsbanden zu beobachten ist, tauchte die Vermutung auf, daß auch für die hohen Extinktionswerte, die bei Weinsäure, Citronensäure und besonders Essigsäure zu beobachten sind, alkoholähnliche Bedingungen im Lösungsmittel verantwortlich sind. So wurde das spektrale Verhalten von Azur A und Toluidinblau in höheren Konzentrationen dieser drei Säuren eingehend untersucht. Die Messungen erfolgten in folgenden Konzentrationsbereichen: Weinsäure 5 - 10 normal, Citronensäure 5 - 12 normal, Essigsäure 6 - 17,5 normal. Die angegebenen Höchstkonzentrationen für Weinsäure und Citronensäure stellen die löslichkeitsbedingten Maximalwerte dieser Störfaktoren in H_2O dar.

In den Abbildungen 11 - 16 wurde der Anstieg der α-Bande von Azur A und Toluidinblau über den 100%-Wert hinaus in Prozent der entsprechenden Maximalwerte des Farbstoffs in rein äthanolischer Lösung aufgetragen, weil hier die höchsten ε-Werte überhaupt erzielt werden und Äthanol somit ein ideales Bezugssystem darstellt. In den Abbildungen entspricht der untere Rand der Säulen dem jeweiligen 100%-Wert, der obere Rand dem Wert von Farbstoff in reiner Säure. Zusätz-

lich ist der Bereich der wirksamen Säurekonzentrationen (in Normalität) angegeben.

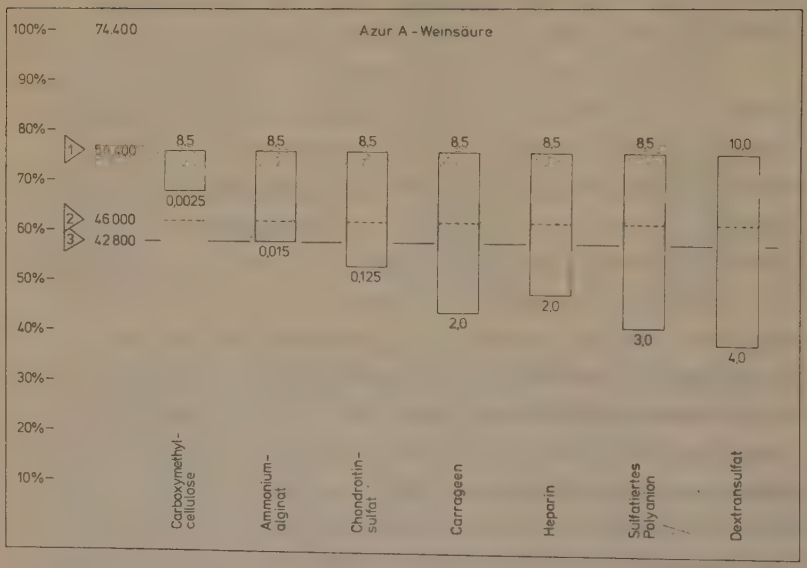


Abb. 11. Anstieg der α-Bande von Azur A nach vollständiger Zerstörung der metachromatischen Reaktion durch Weinsäure in Prozent von ε in äthanolischer Lösung (Farbstoffgehalt $2,5 \times 10^{-5}$ molar).

1 = ε_{max} in reiner Säure

2 = ε von Farbstoff in dünnster wässriger Lösung

3 = ε von Farbstoff der Konzentration $2,5 \times 10^{-5}$ in wässriger Lösung.

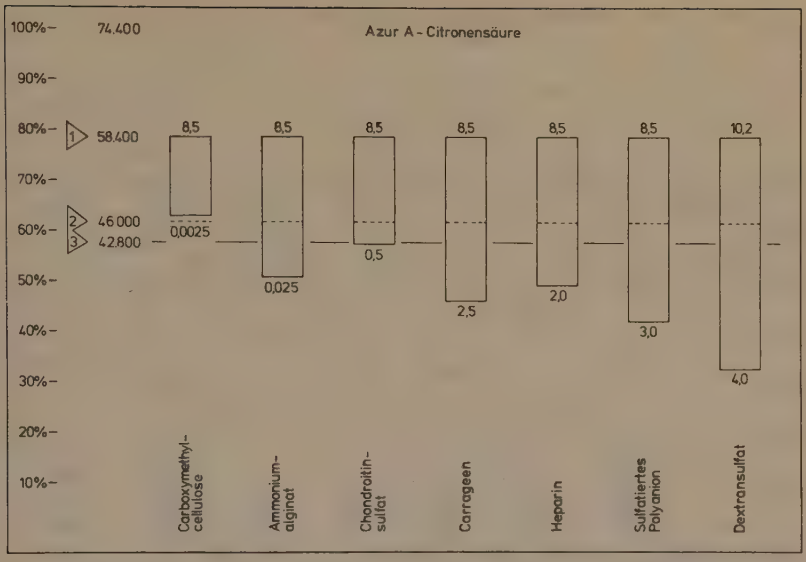


Abb. 12. Anstieg der α-Bande von Azur A nach vollständiger Zerstörung der metachromatischen Reaktion durch Citronensäure (siehe Abb. 11).

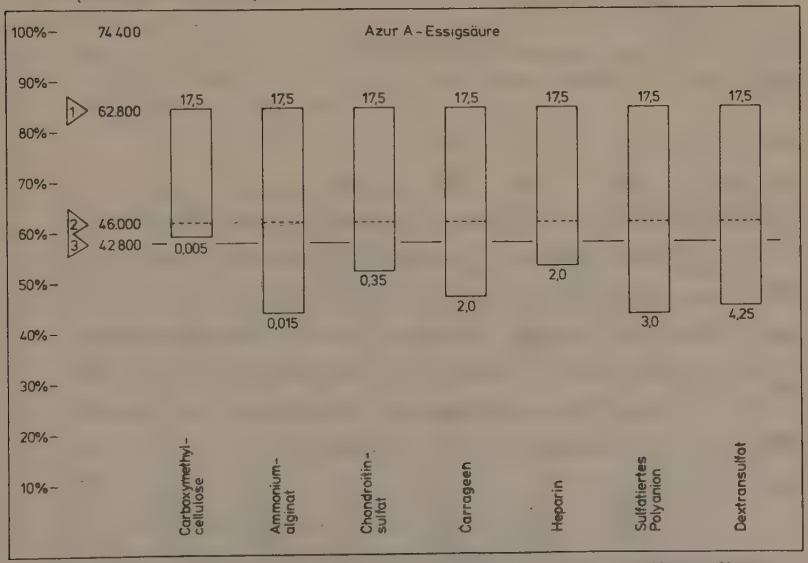


Abb. 13. Anstieg der α-Bande von Azur A nach vollständiger Zerstörung der metachromatischen Reaktion durch Essigsäure. (siehe Abb. 11).

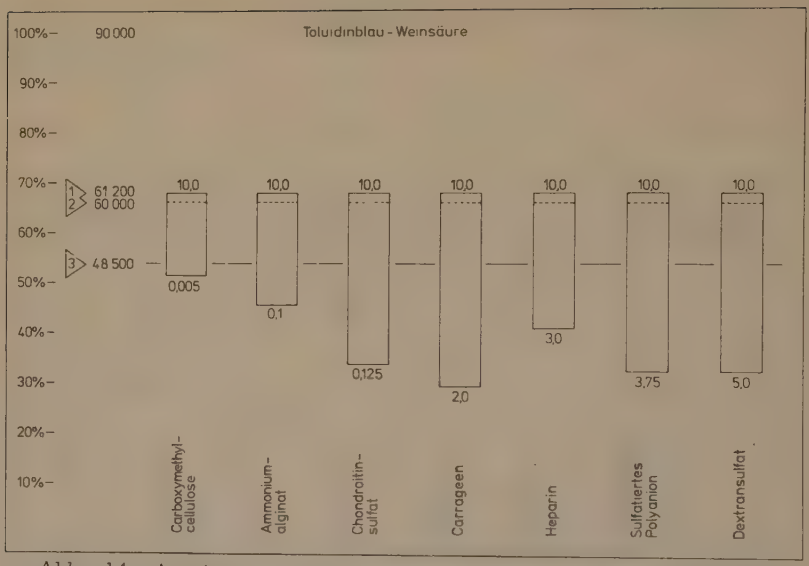


Abb. 14. Anstieg der α-Bande von Toluidinblau nach vollständiger Zerstörung der metachromatischen Reaktion durch Weinsäure in Prozent von ε in äthanolischer Lösung (Farbstoffgehalt $2,5 \times 10^{-5}$ molar).

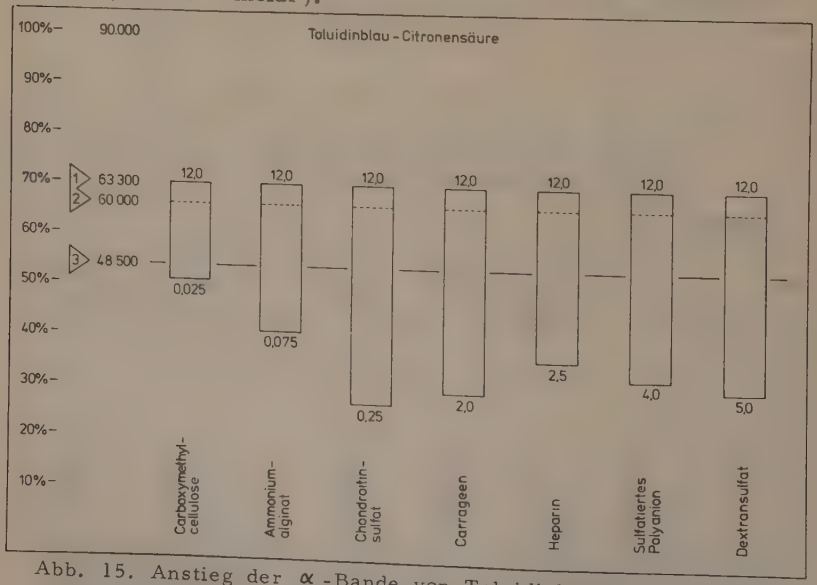


Abb. 15. Anstieg der α-Bande von Toluidinblau nach vollständiger Zerstörung der metachromatischen Reaktion durch Citronensäure (siehe Abb. 14).

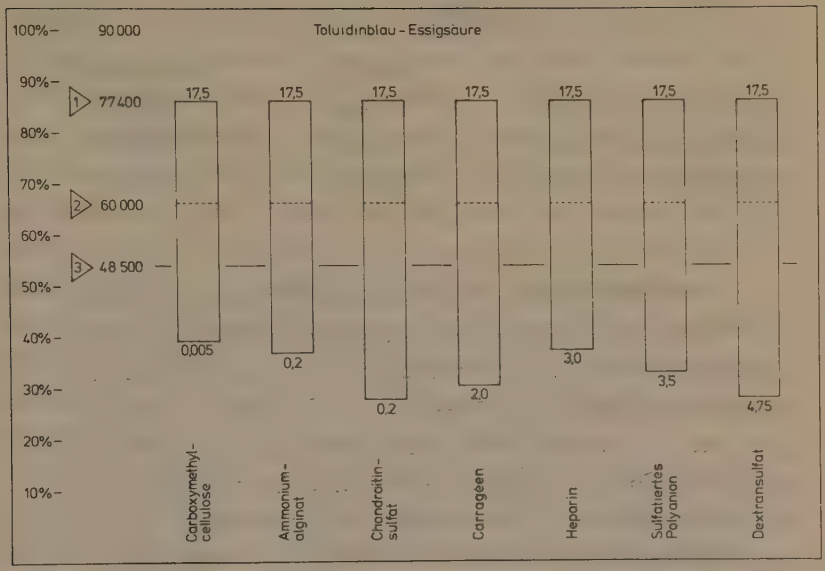


Abb. 16. Anstieg der α-Bande von Toluidinblau nach vollständiger Zerstörung der metachromatischen Reaktion durch Essigsäure (siehe Abb. 14).

Die Abbildungen zeigen, daß in höheren Konzentrationen der drei Säuren nach Zerstörung der Metachromasie ϵ-Werte erreicht werden, die weit über dem Wert für die gleiche Farbstoffkonzentration in rein wässriger Lösung liegen (42.800 für Azur A bzw. 48.500 für Toluidinblau). Die in Anwesenheit von Chromotrop erreichbaren Höchstwerte sind identisch mit den Werten, die die Farbstoffe in reiner Säure erreichen (Tabelle 8).

Tabelle 8

ε_{max} von Azur A und Toluidinblau (jeweils $2,5 \times 10^{-5}$ m) in Säure.

		Azur A	Toluidinblau
Weinsäure	(10n)	56.400	61.200
Citronensäure	(12n)	58.400	63.300
Essigsäure	(17,5n)	62.800	77.400

Die Höhe dieser in konzentrierten Säuren erreichbaren ε-Werte kann jedoch nur bis 46.000 (Azur A) bzw. 60.000 (Toluidinblau) mit der Unterbindung des di- und tetrameren Aggregatszustandes erklärt werden (es gibt keine meßbaren β - bzw. γ-Banden). Bei allen darüberliegenden Meßwerten muß ein zusätzlicher spezifischer Einfluß des Lösungsmittels auf die Absorption des Farbstoffmonomers bestehen. Zwar liegen die maximalen ε-Werte von Wein- bzw. Citronensäure hier nur geringfügig auseinander und insgesamt deutlich unter dem Wert für Essigsäure, doch muß dabei berücksichtigt werden, daß 17,5 normale Essigsäure (Eisessig) ein nahezu unverdünntes organisches Lösungsmittel darstellt, Wein- und Citronensäure (ebenso wie Oxalsäure) dagegen kristalline Substanzen sind, deren Wirkung nur in Form ihrer Lösungen in Wasser untersucht werden kann, wobei durch die weit geringere Löslichkeit dieser Substanzen enge Grenzen gesetzt sind.

Bemerkenswert ist auch die Tatsache, daß bei Säurekonzentrationen im Bereich des 100%-Werts trotz bereits zerstörter Metachromasie in Abhängigkeit von der Art des Chromotrops noch deutliche Unterschiede in der Höhe der α-Bande bestehen (insbesondere bei den Sulfatchromotropen), was auf das Fortbestehen einer Farbstoff-Chromotrop-Beziehung über

den Zerstörungspunkt der metachromatischen Reaktion hinaus schließen läßt. Bei weiterer Säurezugabe wird jedoch der bandendämpfende Einfluß des Chromotrops zunehmend geringer, bis schließlich der "Leerwert" von Farbstoff und Säure auch bei den Sulfatchromotropen annähernd erreicht ist. Besonders deutlich ist der bandendämpfende Einfluß bei SP_{54} ausgeprägt. Er bleibt selbst in den Höchstkonzentrationen von Wein- und Citronensäure noch andeutungsweise erhalten. Da SP_{54} und Dextransulfat jedoch gleiche saure Gruppen sowie nahezu gleiche Ladungsdichten aufweisen, bleibt als mögliche Ursache der erhebliche Unterschied im Molekulargewicht beider Chromotrope. SP_{54} mit einem Molekulargewicht von 2.000 besitzt bei gleicher Gesamtzahl von Sulfatgruppen in Lösung etwa die 250-fache Teilchenzahl gegenüber Dextransulfat (Molekulargewicht = 500.000).

Es wurde schon darauf hingewiesen, daß Veränderungen im Bereich des Lösungsmittels sich in einer Verschiebung der Lage charakteristischer Absorptionsbanden manifestieren können. Der schon visuell erkennbare Grünstich, der in den Höchstkonzentrationen von Wein-, Citronen- und Essigsäure auftritt, war Anlaß, die Lage der α-Bande von Azur A und Toluidinblau unter Einwirkung der Maximalkonzentrationen dieser drei organischen Säuren zu überprüfen. Dabei ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 9

Lage der α-Bande von Azur A und Toluidinblau in höchsten Konzentrationen verschiedener Säuren im Vergleich zu rein wässrigen Lösungen

		Azur A	Toluidinblau
H_2O		630 nm	632 nm
Weinsäure	(10 n)	638 nm	640 nm
Citronensäure	(12 n)	638 nm	640 nm
Essigsäure	(17,5 n)	628 nm	628 nm

Es ist zu erkennen, daß in den Höchstkonzentrationen von Wein- und Citronensäure eine langwellige, bathmochrome Bandenverschiebung auftritt. Bei Essigsäure ist diese Bandenverschiebung (ebenso wie bei Äthanol) hypsochrom. Oxalsäure bewirkt hier ebenso wie bei den maximalen Extinktionswerten keine signifikante Änderung. Sie zeigt somit auch in diesem Punkt ein den anorganischen Säuren sehr ähnliches Verhalten. Da der beschriebene Grünstich der Lösungen jedoch bei allen Säuren sowie Äthanol auftritt, kann er nicht auf einer Bandenverschiebung beruhen. Es sind vielmehr die fehlenden dimeren und polymeren Farbstoffaggregate sowie die extrem schmalen Absorptionsbanden, die für diesen rein visuellen Eindruck verantwortlich gemacht werden müssen. Wichtig ist jedoch der Befund, daß in Gegenwart von Weinsäure, Citronensäure und Essigsäure ähnlich wie bei Äthanol unabhängig von der Zerstörung der metachromatischen Reaktion ein erheblicher Einfluß auf das Absorptionsverhalten der Farbstoffe sowohl hinsichtlich der Bandenhöhe als auch der Bandenlage besteht.

4.12. Metachromasie und Dielektrizitätskonstante

Die Wirkung von Alkoholen auf die metachromatische Reaktion wurde bereits von vielen Autoren zur Substratdifferenzierung herangezogen (z.B. BANK und BUNGENBERG DE JONG, 1939; KRAMER und WINDRUM, 1955; VARUTE und NANAWARE, 1972). LISON (1935a) versuchte damit sogar zwischen "echter" und "falscher" Metachromasie zu unterscheiden. Die metachromasiestörende Wirkung von Alkohol wird auf eine Änderung der Dielektrizitätskonstante (DK bzw. ε) zurückgeführt (SCHEIBE und ZANKER, 1958). Die Dielektrizitätskonstante des Wassers (DK = 80) wird durch Zugabe von Äthanol (DK = 26) herabgesetzt. Mit der DK (ε) wird der Faktor zum Ausdruck gebracht, um den die elektrische Feldstärke zwischen zwei entgegengesetzt geladenen Kondensatorplatten erniedrigt wird, wenn das angenommene Vakuum zwischen diesen Platten mit dem zu prüfenden Medium ausgefüllt wird. Dabei wird für das Vakuum die DK = 1 gesetzt. Alle DK liegen folglich über diesem Wert. Die Größe der DK eines bestimmten Mediums ist abhängig von der Temperatur und der Frequenz, bei der die Messung erfolgt (KOBLET, 1964).

Die hohe Dielektrizitätskonstante für Wasser besagt, daß für Wassermoleküle als Dipol eine große Rotationsfreiheit beim Anlegen eines elektrischen Feldes besteht. Es ist zu erwarten, daß diese besondere Eigenschaft der Wassermoleküle durch die Anwesenheit von polar streng ausgerichteten Komplexen, wie sie die Ionen mit den eigenen abschirmenden Wassermolekülen darstellen, mit zunehmender Konzentration vermindert wird.

Da die Farbstoff-Aggregation in ursächlichem Zusammenhang mit der metachromatischen Eigenschaft des Farbstoffs steht, sind die Ergebnisse von ZANKER (1952b) besonders interessant. In einem solchen Äthanol-Äther-Gemisch von organi-

schen Lösungsmitteln liegt der Farbstoff (hier Akridinorange) im monomeren Zustand vor. Mit einer Senkung der Temperatur (bis -183°C) wird jedoch die Eigenassoziation der Alkoholmolekel unter H-Brückenbildung begünstigt. Dabei steigt die DK in dem Gemisch auf den zwei- bis dreifachen Wert und erreicht so die DK von Wasser bei Normaltemperatur, und als Folge davon ist sogar in diesem organischen Lösungsmittelgemisch eine Dimerisation von Farbstoff-Molekeln zu erreichen.

Während also einerseits durch Senken der Temperatur die DK erhöht wird, kann andererseits durch Erhöhung der Temperatur selbst in Wasser die DK erheblich gesenkt werden (Abb. 17).

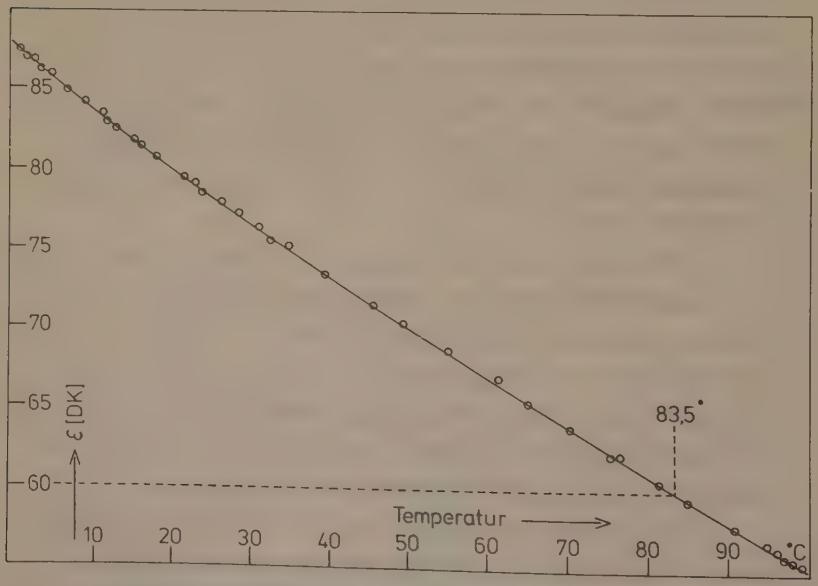


Abb. 17. Dielektrizitätskonstante (DK) von H_2O (nach LANDOLT-BÖRNSTEIN) in Abhängigkeit von der Temperatur.

Wenn aber die bei Normaltemperatur fehlende Dimerisation in Alkohol auf einer niedrigen Dielektrizitätskonstanten beruht, dann ist zu erwarten, daß auch bei entsprechender Erniedrigung der DK von H_2O durch Erwärmung keine Dimerisation oder gar Polymerisation auftritt. Aus den Ergebnissen der Wärmeversuche ist ersichtlich, daß dies bei höheren Temperaturen ($95^{\circ}C$) tatsächlich der Fall ist: Die ε-Werte für Azur A und Toluidinblau liegen sogar etwas über den Maximalwerten in dünnster wässriger Lösung (46.000 bzw. 60.000), die nur dann erreichbar sind, wenn ausschließlich monomere Farbstoff-Kationen in der Lösung vorliegen.

In Alkohol (Äthanol bei $20^{\circ}C$) und in Wasser bei höheren Temperaturen ($83^{\circ}C$) wird die Dimerisation der Thiazinmoleküle untereinander ebenso wie die Ausbildung einer metachromatischen Verbindung verhindert. In beiden genannten Fällen liegt eine Erniedrigung der DK der Farbstofflösung auf Werte von ca. 60 vor. Wird die DK in diesem Sinne verändert, so können die Wassermoleküle die zwischen den einzelnen Farbstoffmolekülen herrschenden COULOMB'schen Kräfte nicht mehr "neutralisieren". Unter den besonderen Bedingungen an der Chromotropoberfläche führt dies zu einem Überwiegen COULOMB'scher Abstoßungskräfte gegenüber den Van-der-WAAL'schen Kräften und damit zum Verlust der Voraussetzung für die Aggregation am Chromotrop und der damit zusammenhängenden Ausbildung eines π-Elektronen-Resonanzsystems.

Obwohl die DK auch noch im höheren Konzentrationsbereich von Neutralsalzen weiter erniedrigt wird und somit ungünstige Voraussetzungen für eine Aggregation an der Oberfläche des Chromotrops bestehen, beginnt gerade hier in den Konzentrationen, die zur Zerstörung der metachromatischen Reaktion führen, eine gleichzeitige Ausbildung des dimeren oder sogar

tetrameren Zustands der Farbstoffmoleküle.

Die so durch Wasserentzug erzwungene Farbstoff-Aggregation ist jedoch ein wesentlich anderer Vorgang, bei dem es sich um einen ähnlichen Effekt handelt, wie er durch Erhöhung der Farbstoffkonzentration auch in H_2O (TOEPFER, 1968) und in extremen Konzentrationen sogar in Alkohol erzwungen werden kann.

Im Hinblick auf das z.T. sehr unterschiedliche Assoziationsverhalten der Thiazine in Gegenwart verschiedener Störfaktoren ist es jedoch nicht leicht, die Diskussion des Einflusses der DK auf die metachromatische Reaktion unter quantitativen Gesichtspunkten zu führen. Da die Bedeutung der DK vor allem in ihrem Einfluß auf die Eigenschaft des Wassers als Dipol zu sehen ist, kann dies allein aufgrund der fehlenden Linearität zwischen DK und Dipolmoment auch gar nicht erwartet werden. Zu viele Einzelfaktoren können in mehr oder weniger komplexer Weise die DK beeinflussen, als daß man sie zum alleinigen Gradmesser der Störfaktorwirkung machen könnte (vgl. auch die Gegenüberstellung von Dipolmoment und DK in NETTER, 1959).

Die quantitativen Zusammenhänge zwischen Metachromasie und DK versuchten in jüngster Zeit u.a. VARUTE und NANAWARE (1972a) zu beleuchten, indem sie die DK verschiedener Alkohole sowie Dioxan mit ihrer metachromasiestörenden Wirkung vergleichen. Sie kommen zu dem Ergebnis, daß die Störfaktorwirkung von Alkoholen bzw. Dioxan, gemessen an der Unterdrückungszeit für die metachromatische Reaktion von Galaktogen, mit abnehmender DK zunimmt:

Alkohol	DK	Unterdrückungszeit (in Minuten)
Methanol	32, 63	30
Äthanol	24, 3	7
n-Propanol	20, 1	5
n-Butanol	17, 1	3
Dioxan	2	2

Die DK-Werte wurden von den genannten Autoren aus LANGEY (1961) entnommen.

Mit Dioxan wird hier zwar der Einfluß der Dielektrizitätskonstante auf die metachromatische Reaktion auch bei einem nicht alkoholischen Störfaktor unterstellt, die Autoren ziehen jedoch in diesem außerordentlich wichtigen Punkt nicht die Konsequenz, einen Einfluß der DK auch bei der Störfaktorwirkung von Säuren und Salzen in Betracht zu ziehen. Vielmehr nehmen sie für diese Substanzen einen grundsätzlich anderen, nämlich kompetitiven Wirkungsmechanismus an.

Es gibt jedoch mehrere Faktoren, so z.B. die große Ähnlichkeit des Kurvenverlaufs beim Anstieg der α-Bande unter Einwirkung von Säuren und Salzen sowie Alkohol bzw. die alkoholähnlichen Einflüsse mehrerer organischer Säuren auf die Absorptions-Charakteristik (Bandenlage und Bandenintensität) von Azur A und Toluidinblau, die Anlaß geben, die Rolle der DK im Zusammenhang mit der Wirkung von Säuren (bzw. Salzen) auf die metachromatische Reaktion zu diskutieren.

In Abbildung 18 wird deshalb versucht, am Beispiel einiger Säuren (HCl, Weinsäure, Essigsäure) und Salze ($MgCl_2$, NaCl) sowie Äthanol zu zeigen, wieweit die DK von Wasser durch Zugabe dieser Störfaktoren erniedrigt wird (Werte aus LANDOLT-BÖRNSTEIN, 1959).

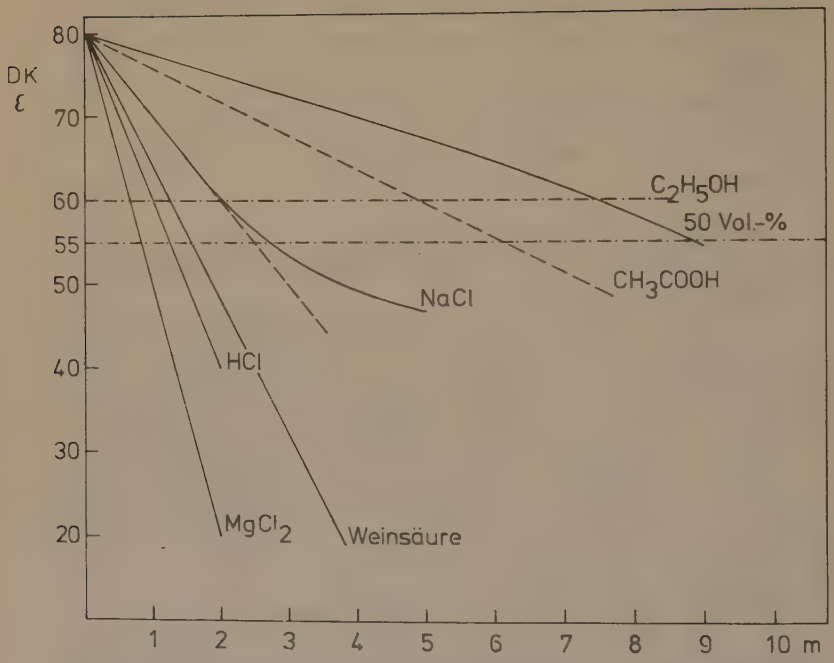


Abb. 18. Erniedrigung der Dielektrizitätskonstante (ε) des Wassers in Abhängigkeit von der Konzentration verschiedener Störfaktoren.

Danach ist beispielsweise in einmolarer HCl die DK gegenüber der des Wassers von 80 auf 60 herabgesetzt. Dieser Wert entspricht etwa der DK einer 50%-igen Äthanollösung, von der wir wissen, daß sie die metachromatische Reaktion unter vergleichbaren Bedingungen, d.h. in vitro, weitgehend aufhebt. Ebenso lassen auch die anderen eingezeichneten Säuren erkennen, daß sie im hier untersuchten Konzentrationsbereich einen beträchtlichen Einfluß auf die DK ausüben.

Die Aufstellung exakter qualitativer Beziehungen zwischen der Zerstörung der metachromatischen Reaktion und der DK ist jedoch gegenwärtig noch mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Soweit Literaturangaben für die ε-Werte der einzelnen Störfaktoren überhaupt erhältlich sind, unterscheiden sie sich z.T. erheblich. Dies liegt einerseits an der Messung bei unterschiedlichen Wellenlängen, andererseits an der starken Temperaturabhängigkeit dieser physikalischen Größe. Doch auch bei gleicher Temperatur und Wellenlänge gelangen verschiedene Autoren nicht immer zu übereinstimmenden Werten (LANDOLT-BÖRNSTEIN, 1959; LANGEY, 1961; KORTÜM, 1970).

Im speziellen Fall von Metachromasiestudien ist zu berücksichtigen, daß die DK ebenso wie der pH-Wert eine für uns nur "makroskopisch" meßbare Größe ist, die nur als Durchschnittswert für das Gesamtvolumen einer wässrigen Lösung ermittelt werden kann. Es ist jedoch mit Sicherheit anzunehmen, daß an der Oberfläche der Chromotrop-Moleküle - einmal durch den Einfluß des Makromoleküls selbst und zum anderen durch eine relative Häufung der verschiedenen in Lösung befindlichen Ionen - besondere Bedingungen herrschen, die gerade auch für die DK abweichende, in diesem Fall geringere Werte ergeben, als sie für das Gesamtvolumen der Lösung festgestellt werden können. Dies gilt besonders auch für die Bedingungen an und zwischen den Oberflächen eines histologischen Präparates.

Trotz dieser Einschränkung besteht jedoch kein Zweifel, daß die DK durch Zugabe von Säuren in jedem Fall absinkt, wie groß auch immer die Differenz zum aktuellen Wert an der Oberfläche oder im Inneren eines makromolekularen Knäuels bzw. histologischen Schnittes sein mag. Es erscheint wenig glaubhaft, daß die Erniedrigung der DK die metachromatische Reaktion nur dann stört, wenn sie auf Alkoholzugabe beruht, während eine gleichwertige Änderung dieser physikalischen Größe durch Säuren wirkungslos sein soll.

4.13. Die Resistenz der metachromatischen Reaktion am histologischen Präparat

Nach Feststellung der quantitativen Relationen zwischen Chromotrop und Störfaktor in vitro sollte an einigen Beispielen die Beziehung zur metachromatischen Reaktion am histologischen Präparat hergestellt werden. An unfixierten Kryostatschnitten von Trachea und Colon der Ratte (Whistar) wurde die Gültigkeit des 50%- bzw. 100%-Wertes der metachromatischen Verbindung von Heparin und Toluidinblau überprüft. Die Anwendung dieser spezifischen Störfaktorkonzentration ergibt sich aus der Überlegung, daß die in sämtlichen Präparaten anzutreffenden (heparinhaltigen) Mastzellen für diesen speziellen Vergleichszweck einen optimalen Orientierungspunkt darstellen. Die untersuchten Präparate (Trachea und Colon) des verwendeten Versuchstiers bieten die Möglichkeit, neben Mastzellen auch andere metachromatisch reagierende Strukturen wie submucöse Drüsenzellen mit intra- und extrazellulärem Schleim, Knorpelzellen sowie Becherzellen und ihr intra- bzw. extrazelluläres Sekret vergleichend in ihrer Resistenz zu beurteilen.

Färbt man ein histologisches Präparat mit Azur A oder Toluidinblau und setzt es anschließend nach kurzer Verweildauer in aqua dest. einer Säure als Störfaktor aus, so tritt bereits nach kurzer Zeit ein signifikanter Unterschied zur Metachromasie in Lösung auf: Während sich in vitro schlagartig nach Zugabe des Störfaktors ein auch spektralphotometrisch stabiler, absolut endgültiger Zustand einstellt, der im verschlossenen Reagenzglas selbst nach mehreren Monaten keine Veränderungen des spektralen Bildes zeigt, muß bei Einwirkung von Störfaktoren auf das histologische Präparat ein Zeitfaktor beachtet werden. Hierbei kann die Einwirkung der Säuren allgemein in zwei Abschnitte

unterteilt werden: Beim ersten Zeitabschnitt handelt es sich um eine "Sofortwirkung" (bis drei Sekunden: einmaliges kurzes Eintauchen und sofortiges Verbringen des Schnittes in aqua dest.) und zum andern um eine weitere, sich zeitlich erheblich verzögert einstellende Zerstörung der metachromatischen Bindung im Zeitraum von fünf Minuten (für HCl) bis dreißig Minuten (für Weinsäure, Citronensäure und Essigsäure) bei den jeweiligen 100%-Werten. Wie aus einer allgemeinen schematischen Darstellung (Abb. 19) ersichtlich, erreicht die "Sofortwirkung" (S) ca. 25% - 30% der endgültigen Einwirkung des Störfaktors.

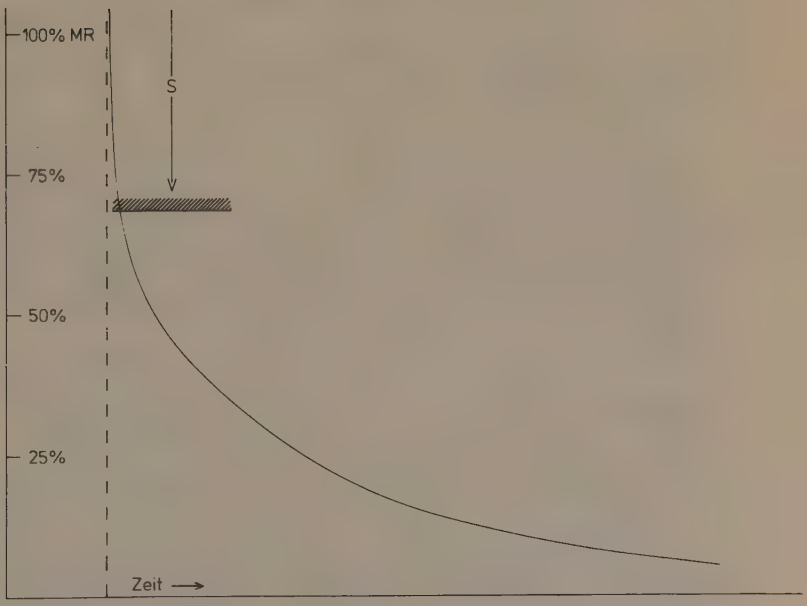


Abb. 19. Abnahme der Metachromasie am histologischen Präparat unter Einwirkung von Säure in Abhängigkeit von der Zeit (schematische Darstellung).

Verwendet man den 50%-Wert als Konzentration des Störfaktors am histologischen Schnitt über längere Zeit (30 - 60 Minuten), so wird die Metachromasie schließlich vollständig aufgehoben, obwohl die gleiche Konzentration der jeweiligen Säure die Reaktion zwischen Polyanionen und Farbstoff-Kationen in Lösung schlagartig zur Hälfte zerstört.

Bei der histologischen Beurteilung von Trachea und Colon der Ratte konnten unter Einwirkung der verschiedenen Säuren auf die gefärbten Präparate folgende allgemeine Befunde erhoben werden:

1. Weitgehendes Ablösen des orthochromatisch gebundenen sowie eines Teils des metachromatisch gebundenen Farbstoffs innerhalb der ersten Sekunden ("Sofortwirkung"). Wahrscheinlich handelt es sich im wesentlichen um den an COOH-Gruppen gebundenen Farbstoff, da hier die Konzentration der Störfaktoren dem 50%- bzw. 100%-Wert von Heparin entsprach.
2. Bei Einwirkung von Säuren werden am Präparat in Abhängigkeit von der Art und Konzentration des Störfaktors sämtliche Stadien der Zerstörung der Metachromasie in kürzerer oder längerer Zeit durchlaufen, die in vitro bei Fehlen eines Zeitfaktors nur mit vielen Konzentrationsstufen des jeweiligen Störfaktors einzeln dargestellt werden können.
3. Die Zerstörung der Metachromasie ist in der Regel mit einer Entfärbung des Präparats verbunden. Eine Ausnahme bildet dabei der extrazelluläre Becherzellschleim im Colon. Hier ist ein allmählicher Umschlag des metachromatischen Farbtons in den orthochromatischen zu beobachten, bevor dann aber auch hier die Entfärbung eintritt. Es besteht somit keine direkte Gesetzmäßigkeit zwischen der Aufhebung der Metachromasie und der Entfärbung eines Präparats.

4. Der Unterschied zwischen der Einwirkung vom 50%- und 100%-Wert besteht im wesentlichen im unterschiedlichen Verzögerungsfaktor bei der Entfärbung. Während beispielsweise die Metachromasie des hyalinen Knorpels beim 100%-Wert von HCl bereits nach einer Minute etwa zur Hälfte reduziert ist, stellt sich derselbe Zustand bei Einwirkung des 50%-Werts erst nach fünf Minuten ein. Die entsprechenden Zeiten für Mastzellen liegen bei fünf (100%-Wert) bzw. fünfzehn Minuten (50%-Wert).

Entsprechend den bisherigen Ausführungen läßt sich die Säurewirkung am Präparat einmal in eine "Sofortwirkung" beim Eintauchen des Präparats in den Störfaktor und zum anderen in eine "Langzeitwirkung" mit allmählicher Entfärbung des Gewebes unterteilen (Abb. 19).

Der Unterschied im Zeitfaktor, d.h. sofortige und endgültige Reaktion in Lösung und allmähliche Einwirkung am histologischen Präparat ließe sich dadurch erklären, daß für den Störfaktor am Gewebe eine wesentlich kleinere Angriffsfläche besteht. Während in der wässrigen Lösung alle metachromatischen Verbindungen in unmittelbarem Kontakt mit dem Störfaktor treten können, trifft dies beim histologischen Präparat nur für die oberflächliche Schicht zu. Für die restlichen metachromatischen Bindungen muß der Störfaktor in die tieferen Schichten des Präparates in Form seiner Ionen eindringen.

Dies erklärt jedoch noch nicht die totale Entfärbung des Präparates durch den 50%-Wert bei längeren Einwirkungszeiten (bis zu 60 Minuten). Es ist zu vermuten, daß die Entfärbung auf dem fehlenden Gleichgewicht zwischen metachromatisch gebundenem Farbstoff und dem monomeren Farbstoff in Lösung beruht. Vieles spricht dafür, daß in der Lösung zwischen Metachromasie und Orthochromasie Gleichgewichtsbedingungen herr-

schen, da selbst bei optimalem Verhältnis von Farbstoff zu Chromotrop ein geringer Rest monomerer Farbstoffmoleküle nachzuweisen ist. Am Präparat kann sich ein solches Gleichgewicht nicht ausbilden, da hier ein nahezu unendliches Mengenverhältnis zwischen Farbstoff und Chromotrop einerseits bzw. Störfaktor andererseits besteht. Wird - begünstigt durch die Anwesenheit der Säure - ein Farbstoff-Molekül vom Chromotrop abgelöst, so verliert es sich in einem vergleichsweise unendlichen Störfaktorvolumen mit entsprechend geringer Wahrscheinlichkeit, wieder einen freien Bindungsplatz zu finden. Die Farbstoffkonzentration in der Küvette liegt weit unter der minimalen metachromogenen Farbstoffkonzentration.

Kritische Betrachtungen zur Untersuchung der metachromatischen Reaktion in Lösung und am histologischen Präparat

Die hier dargestellten Befunde ermöglichen die Aufstellung einer Hypothese, nach der die Wirkung aller bisher verwendeten Störfaktoren für die metachromatische Reaktion auf eine gemeinsame Ursache zurückzuführen ist. Die Angabe eines Patentrezepts, durch das ein bestimmtes Chromotrop am histologischen Präparat selektiv und quantitativ nachgewiesen werden kann, indem man beispielsweise beim Verschwinden der Metachromasie einer bestimmten Struktur aus einer Tabelle das gesuchte Chromotrop lediglich anhand der wirksamen Störfaktorkonzentration abliest, ist dagegen weder beabsichtigt noch in dieser Form durchführbar. Abgesehen von der Tatsache, daß von den zahlreichen Chromotropen, die zu einer metachromatischen Reaktion befähigt sind, nur ein Bruchteil berücksichtigt werden kann, stehen dem vor allem die bereits ausführlich beschriebenen Unterschiede zwischen der Metachromasie in Lösung und am Präparat im Wege. Eine wichtige Rolle spielen dabei die Eiweißbindungen der Mucopolysaccharide sowie das gleichzeitige Vorkommen verschiedener Vertreter dieser Substratgruppe in vivo. Zusätzlich wirkt sich die Tatsache aus, daß die im Organismus vorkommenden Mucopolysaccharide nicht als definierte Modellsubstanzen vorliegen wie bei den Untersuchungen im Reagenzglas.

Wenn auch fixationsbedingte verfälschende Einflüsse mit Kryostatschnitten umgangen werden können und verfeinerte histologische Meßverfahren (Mikrospektrophotometrie) eine subjektive Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse weitgehend ausschalten, gibt es noch eine Reihe weiterer Faktoren, die beim Vergleich zwischen den Befunden in Lösung und am histologischen Präparat zu berücksichtigen sind. Der wichtigste Punkt ist hierbei das zusätzliche Auftreten eines Zeitfaktors bei der Unter-

drückung der Metachromasie am Präparat, wenn dies in eine störfaktorhaltige Küvette verbracht wird. Eine exakte Differenzierung der Mucopolysaccharide im histologischen Präparat ist durch Variation der Einwirkungszeit der jeweiligen Säure jedoch nicht möglich, da hierzu vergleichende Kontrollen an Lösungen erforderlich wären. Um zu gesicherten Aussagen zu kommen, muß der entfärbende Einfluß des Zeitfaktors ausgeschaltet werden, dessen Ursachen hauptsächlich im fehlenden Gleichgewicht von metachromatischem Komplex und Störfaktorvolumen liegen. Hierzu wurden metachromatisch gefärbte Kryostatschnitte nach der von WINCKLER (1970) beschriebenen Methode gefriergetrocknet und anschließend mit einem Tropfen Störfaktor benetzt. So wurde weitgehend eine Verdünnung der Säurekonzentration an der Oberfläche und in der Tiefe des histologischen Schnittes vermieden. Die beim Trocknen metachromatisch gefärbter Präparate unvermeidliche Orthochromasie schlug nach Zugabe von (wässrigen) Störfaktorlösungen wieder so weit in Metachromasie um, wie es die Stabilität der metachromatischen Reaktion gegenüber dem jeweiligen Störfaktor bei den einzelnen Mucopolysacchariden zuläßt. Auf diese Art konnten Ergebnisse gewonnen werden, die weitgehend mit den Befunden an Lösungen vergleichbar sind.

In vitro-Befunde, die spektralphotometrisch erhalten wurden, haben für das histologische Präparat mehr qualitative als quantitative Bedeutung, weil am Präparat nur die Abnahme der μ-Bande (also die Restmetachromasie), nicht jedoch die Zunahme der α-Bande als Maß für die Unterdrückung der Metachromasie herangezogen werden kann.

Es ist aus diesen Gründen selbstverständlich, daß auch unter optimalen Bedingungen ein in vitro erhaltener 50%- bzw. 100%-Wert nur mit größter Vorsicht auf die Verhältnisse am histologischen Präparat zu übertragen ist, was durch die er-

gänzenden Untersuchungen an Gefrierschnitten bestätigt werden konnte. Untersucht man die metachromatische Reaktion eines histologischen Präparats unter solchen definierten Bedingungen, so ist zunächst im Hinblick auf die Vielzahl metachromatisch angefärbter Mucopolysaccharide die Frage zu klären, welcher 50%- (100%)-Wert überhaupt zur Anwendung kommen soll.

Die Auswahl eines bestimmten 50%- oder 100%-Werts (z.B. für Toluidinblau/Heparin/HCl) setzt notwendigerweise voraus, daß dem Untersucher die Mucopolysaccharide bzw. die Mucopolysaccharid-Kombination der zu prüfenden histologischen Struktur qualitativ bekannt sind. Da die rein qualitative Analyse biologischer Strukturen jedoch aus biochemischer Sicht keine grundsätzlichen Schwierigkeiten bereitet, besteht die eigentliche Problematik darin, bestimmte Mucopolysaccharide histotopochemisch, also am Ort ihres natürlichen Vorkommens, nachzuweisen, wo sie sich den klassischen chemischen Nachweismethoden entziehen. Erst wenn der Katalog der in Frage kommenden Chromotrope auf wenige Mucopolysaccharide reduziert ist, könnte das differentialdiagnostische Instrumentarium unterschiedlicher Störfaktorkonzentrationen gezielt, d.h. mit Aussicht auf Erfolg eingesetzt werden. Die vorliegende Untersuchung mit mehreren Störfaktoren bietet den Vorteil, in bestimmten Zweifelsfällen einen Störfaktor durch einen anderen zu ersetzen, der zwischen zwei interessierenden Chromotropen den jeweils größeren Unterschied im 50%- bzw. 100%-Wert aufweist.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, welcher der hier untersuchten Störfaktoren aufgrund seiner spezifischen Eigenschaften zu empfehlen ist. Abgesehen von der Phosphorsäure ist es im Reagenzglas für das Differenzierungsergebnis unwesentlich, welche Säure herangezogen wird, da hier kein Zeitfaktor auftritt und die Konzentrationsunterschiede, bei denen die metachromatische Reaktion zerstört wird, für alle Säuren

annähernd gleich sind (innerhalb der hier untersuchten metachromatischen Systeme ca. vier Zehnerpotenzen der Säurekonzentration).

Für Messungen, die auf der Zunahme der α-Bande als Maß für die Aufhebung der metachromatischen Reaktion beruhen, gilt jedoch die Einschränkung, daß hier vorzugsweise Säuren verwendet werden sollten, die selbst einen möglichst geringen spezifischen Einfluß auf die Bandenhöhe ausüben, da die Aussagekraft der Ergebnisse zunimmt, wenn sich die Extinktion nach vollständiger Aufhebung der metachromatischen Reaktion nicht oder nur noch unwesentlich ändert (HCl, H_2SO_4, eventuell auch Oxalsäure).

Bei Differenzierungsversuchen am histologischen Präparat empfiehlt es sich, ausschließlich starke Mineralsäuren (wie HCl oder H_2SO_4) anzuwenden, da eine möglichst starke "Sofortwirkung" gefordert werden muß (siehe Abb. 19), um eine längere Verweildauer des Präparates in der Lösung mit allen Nachteilen unkontrollierbarer Prozesse wie Quellung, Lösung der Mucopolysaccharide etc. möglichst zu vermeiden. Wie BALAZS und SZIRMAI (1958a und 1958b) und SZIRMAI (1963) zeigen konnten, übt bereits rein wässriges Milieu eine erhebliche Extraktionswirkung auf Mucopolysaccharide aus, die - je nach Präparat und Einwirkungszeit - bis zu 95% betragen kann (Hahnenkamm). Selbst bei Knorpel (Rindernasenseptum) wurde eine Extraktion von Mucopolysacchariden durch Wasser in Höhe von 40% festgestellt. Bei den hier untersuchten organischen Säuren, deren Anwendung mit einer wesentlich längeren Einwirkungszeit verbunden ist, fällt das Differenzierungsergebnis aus den genannten Gründen schon rein visuell erheblich schlechter aus. Bei längerer Einwirkungszeit von Säuren entsteht ein zunehmend verwaschen wirkendes, schlecht differenziertes Bild.

Erinnert man sich an die Tatsache, daß die Salzsäure im Verlauf der Untersuchungen die geringste Anionenwirkung gezeigt hat und auch im Schrifttum von allen Säuren am weitaus häufigsten zur Anwendung gelangte, so ergibt sich die Forderung, diesen Störfaktor zur Grundlage von sowohl qualitativen als auch quantitativen metachromatischen Untersuchungen zu machen und andere Säuren nur im Ausnahmefall heranzuziehen.

Die Beantwortung der Frage, welcher der hier verwendeten Farbstoffe (Azur A und Toluidinblau) bessere Eigenschaften besitzt, hängt weitgehend von der Problemstellung der jeweiligen Untersuchung ab. Für rein quantitative Messungen auf der Grundlage des Anstiegs der α-Bande ist Azur A zweifellos besser geeignet als Toluidinblau, weil sein Dimerisationsgrad bei der verwendeten Farbstoffkonzentration ($2,5 \times 10^{-5}$) erheblich geringer ist und sich somit Änderungen des Reaktionsmilieus, die einen Einfluß auf die Dimerisation haben, weit weniger auswirken können (Azur A befolgt das LAMBERT-BEER'sche Gesetz strenger als Toluidinblau). Was jedoch die hier besonders interessierenden theoretischen Details der Störfaktorwirkung anbelangt, so haben die vorliegenden Untersuchungen gezeigt, daß gerade die dimere Bande von Toluidinblau als sensibler Gradmesser für Milieuänderungen bei der Interpretation der Befunde eine wertvolle Hilfe ist.

Was schließlich die rein histologischen Qualitäten von Thiazin-Farbstoffen betrifft, die sich im wesentlichen aus der Stärke des visuell erkennbaren Farbwechsels und dem Grad der Differenzierung metachromatischer Strukturen untereinander zusammensetzen, so besitzt derzeit nur ein Vertreter dieser Farbstoffgruppe wirklich hervorragende Eigenschaften: das 1:9-Dimethyl-Methylenblau. Dieser Farbstoff ist ebenso wie Azur A und Toluidinblau in höchster Qualität (DIN 58981) seit kurzer Zeit käuflich zu erhalten (Fa. Serva, Heidelberg).

5. Zusammenfassung

Es wurde der Einfluß von insgesamt sieben Säuren (Salzsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure, Oxalsäure, Weinsäure, Citronensäure und Essigsäure) auf die metachromatische Reaktion von Azur A und Toluidinblau mit sieben Chromotropen (Carboxymethylcellulose, Alginat, Chondroitinsulfat, Carrageen, Heparin, SP_{54} und Dextransulfat) in Lösung spektralphotometrisch untersucht. Als Maß diente die Zunahme der orthochromatischen (α-) Bande.

Bei Zerstörung der Metachromasie erfolgt der metachromatisch-orthochromatische Farbumschlag nicht im Sinn eines Indikatorumschlags am Titrations-Endpunkt, sondern zeigt aufgrund seines kontinuierlichen Ablaufs eindeutige Beziehungen zur Quantität des jeweiligen Störfaktors.

Die Resistenz der metachromatischen Reaktion gegenüber Säuren steigt bei den einzelnen Chromotropen entsprechend der wirksamen Ladungsdichte in folgender Reihenfolge: Carboxymethylcellulose < Alginat < Chondroitinsulfat < Carrageen < Heparin < SP_{54} < Dextransulfat. Dabei ist bei gleicher Ladungsdichte (Sulfatgruppen) keine Abhängigkeit vom Molekulargewicht festzustellen.

Innerhalb der hier verwendeten Farbstoff-Chargen besitzt Toluidinblau in seiner metachromatischen Reaktion im Vergleich zu Azur A eine größere Resistenz gegenüber Säuren.

Die metachromasiestörende Wirkung von Säuren ist nicht gleichzusetzen mit der Wirkung des Hydronium-Ions; es ergeben sich vielmehr signifikante Unterschiede im Auslöschungs-pH-Wert bei Zerstörung einer definierten metachromatischen Verbindung durch verschiedene Säuren.

Im Durchschnitt aller Versuchsreihen erweisen sich Salzsäure, Schwefelsäure und Oxalsäure als starke, Weinsäure,

Citronensäure, Essigsäure und Phosphorsäure als schwache Störfaktoren.

Die Zerstörung der Metachromasie in Lösung erfolgt bei Störfaktorzugabe schlagartig bis zu dem Punkt, der für die jeweilige Konzentration eines bestimmten Störfaktors charakteristisch ist.

Für die Auslöschung der metachromatischen Reaktion durch zunehmende Säurekonzentrationen und die dabei auftretende Erniedrigung der Dielektrizitätskonstante muß ein ursächlicher Zusammenhang angenommen werden.

Weinsäure, Citronensäure und Essigsäure üben in höheren Konzentrationen einen Einfluß auf die spezifische Absorption des monomeren Farbstoff-Kations aus (Erhöhung der Absorption über die Maximalwerte in wässrigen Lösungen sowie Änderung der Bandenlage).

Am histologischen Präparat kann die Zerstörung der Metachromasie in eine "Sofortwirkung" beim Eintauchen des Präparats und eine "Langzeitwirkung" bis zur vollständigen Entfärbung unterteilt werden.

Quantitative Aspekte der metachromatischen Reaktion, speziell der Einfluß von Störfaktoren, können am histologischen Präparat nur mikrospektrophotometrisch anhand der Abnahme der μ-Bande untersucht werden. Im Gegensatz hierzu können bei der Metachromasie in Lösung präzise Ergebnisse durch Registrierung der orthochromatischen (α-) Bande erhalten werden.

Unter Verwendung von gefriergetrockneten Kryostatschnitten wurde versucht, eine Beziehung zwischen der Metachromasie in Lösung und am Präparat herzustellen. Dabei ergibt sich unter den hier geforderten Bedingungen die Möglichkeit eines qualitativen Vergleichs.

6. Abbildungsteil

Abb. 20 - 26. Anstieg der α-Bande von Azur A bei Zerstörung verschiedener metachromatischer Verbindungen durch steigende Konzentrationen von jeweils einer bestimmten Säure als Störfaktor. Die Abstände der Kurven sind Ausdruck der unterschiedlichen Resistenz der einzelnen metachromatischen Verbindungen.

Abb. 27 - 33. Anstieg der α-Bande von Toluidinblau bei Zerstörung verschiedener metachromatischer Verbindungen durch steigende Konzentrationen von jeweils einer bestimmten Säure als Störfaktor. Die Abstände der Kurven sind Ausdruck der unterschiedlichen Resistenz der einzelnen metachromatischen Verbindungen.

Abb. 34 - 40. Anstieg der α-Bande von Azur A bei Zerstörung jeweils einer definierten metachromatischen Verbindung durch steigende Konzentration verschiedener Säuren.

Abb. 41 - 47. Anstieg der α-Bande von Toluidinblau bei Zerstörung jeweils einer definierten metachromatischen Verbindung durch steigende Konzentration verschiedener Säuren.

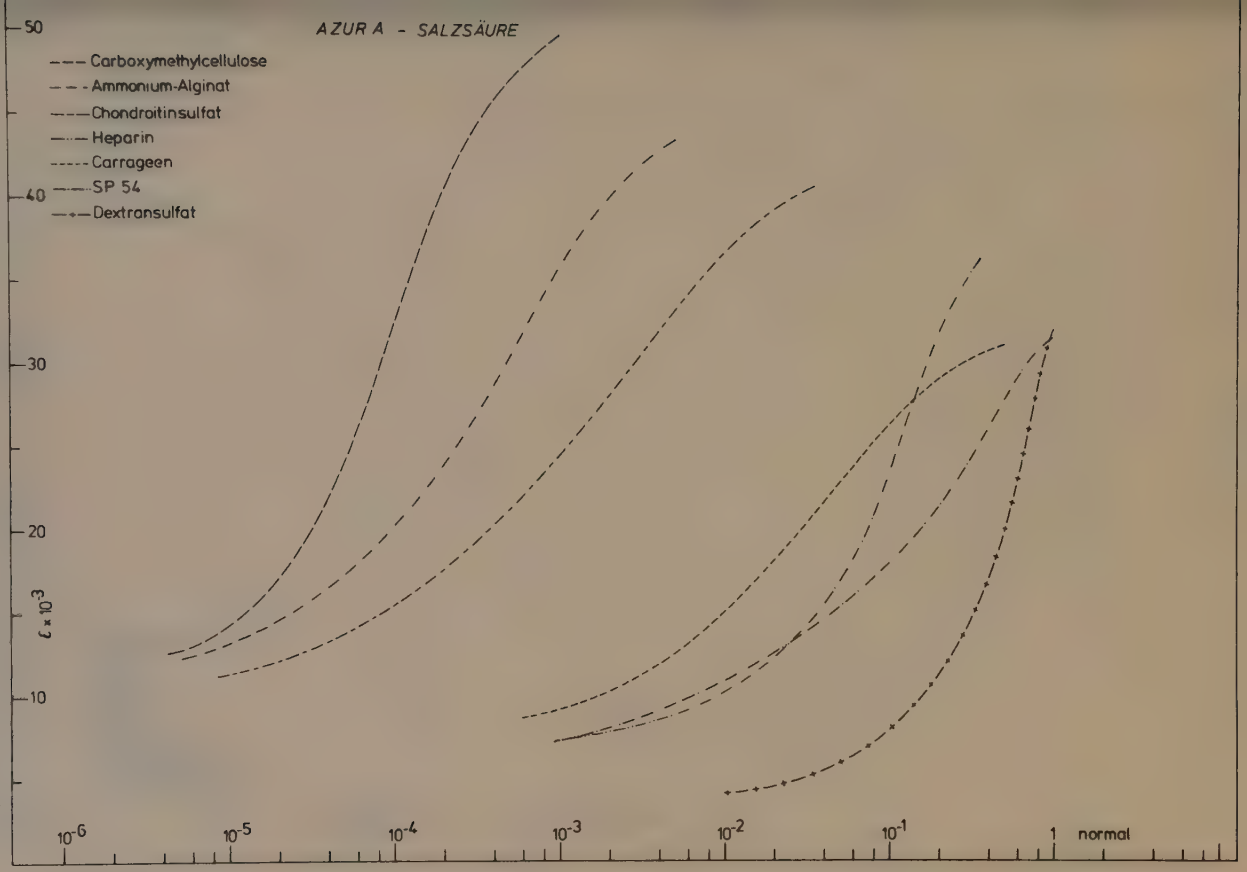


Abb. 20. Anstieg der orthochromatischen Bande von Azur A bei Zerstörung verschiedener metachromatischer Verbindungen durch steigende Konzentration von Säure.

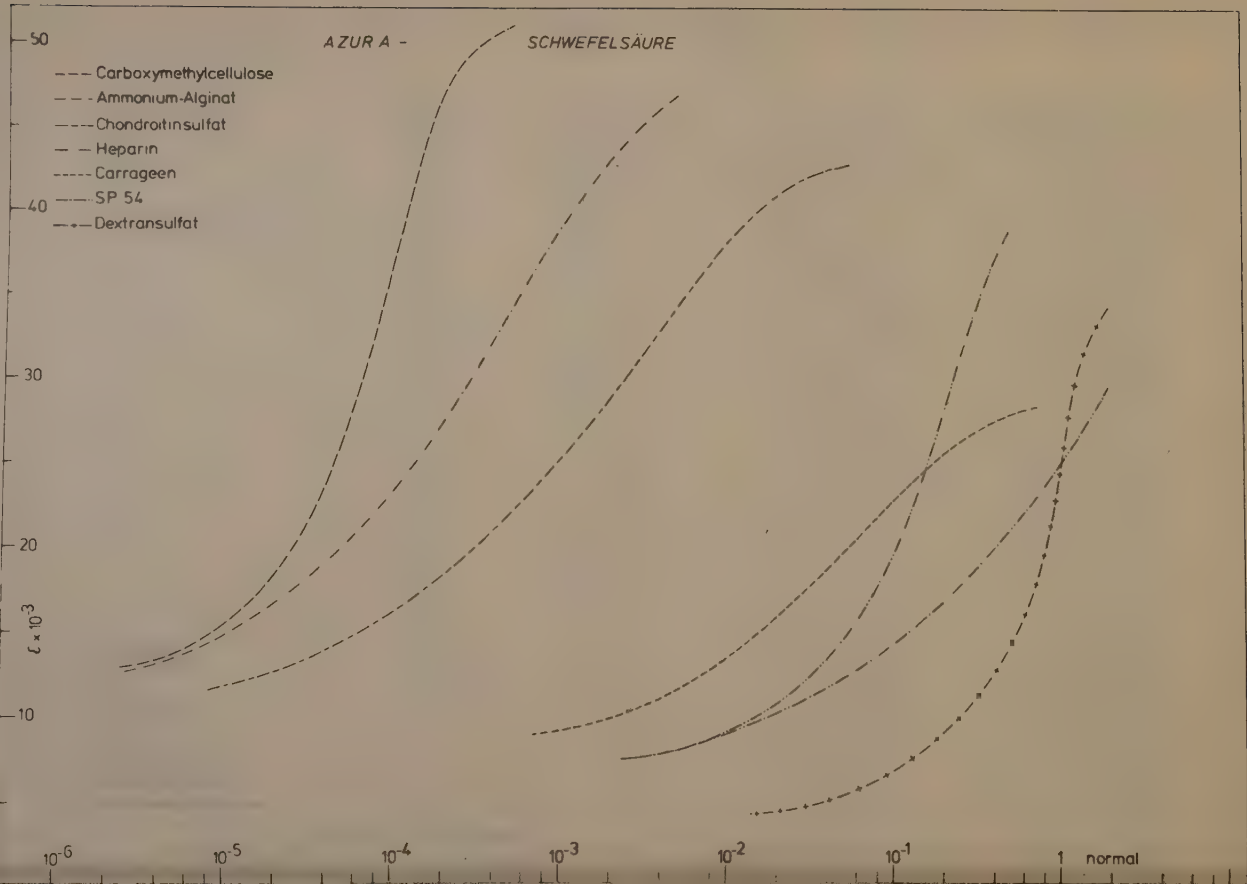


Abb. 21. (Legen-

de s. Abb. 20)

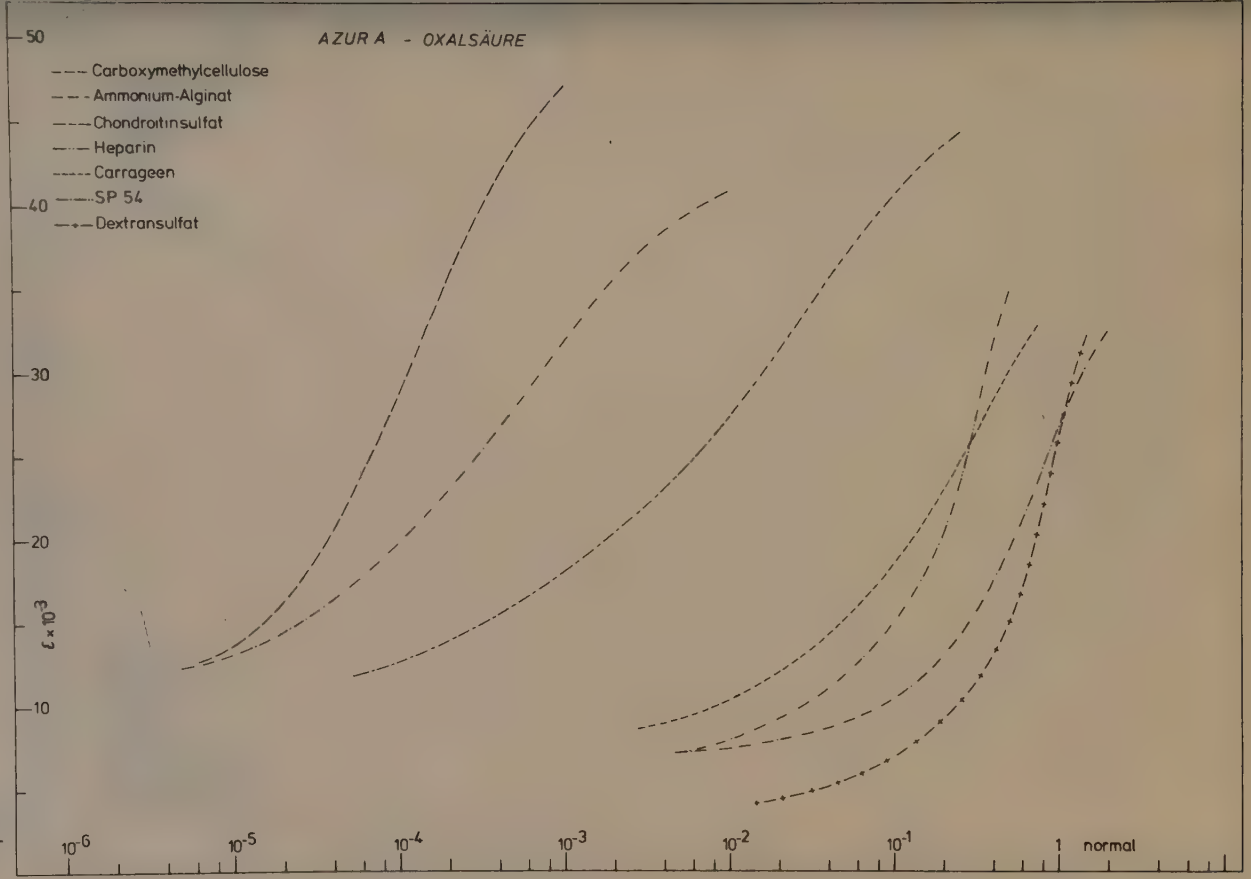


Abb. 22. (Legende s. Abb. 20).

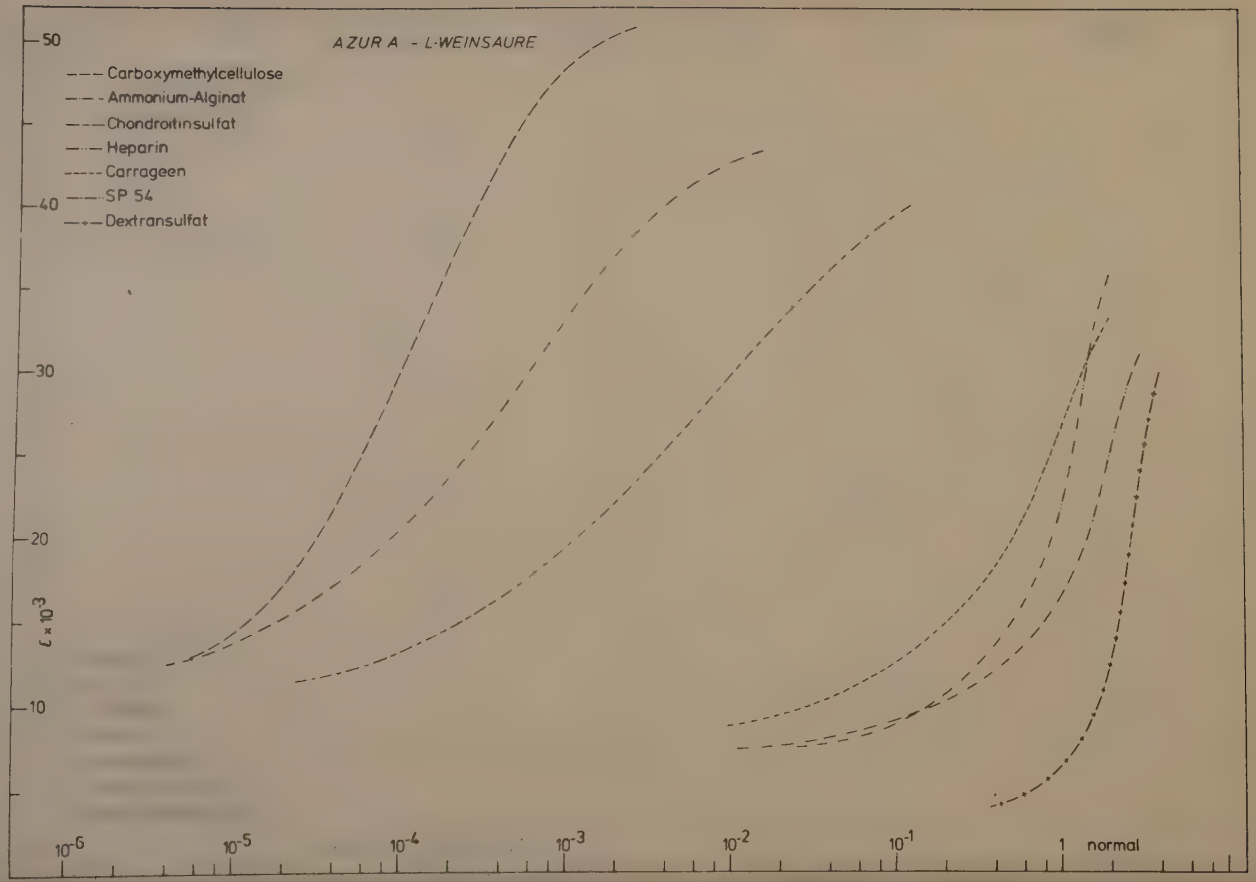


Abb. 23. (Legende s. Abb. 20).

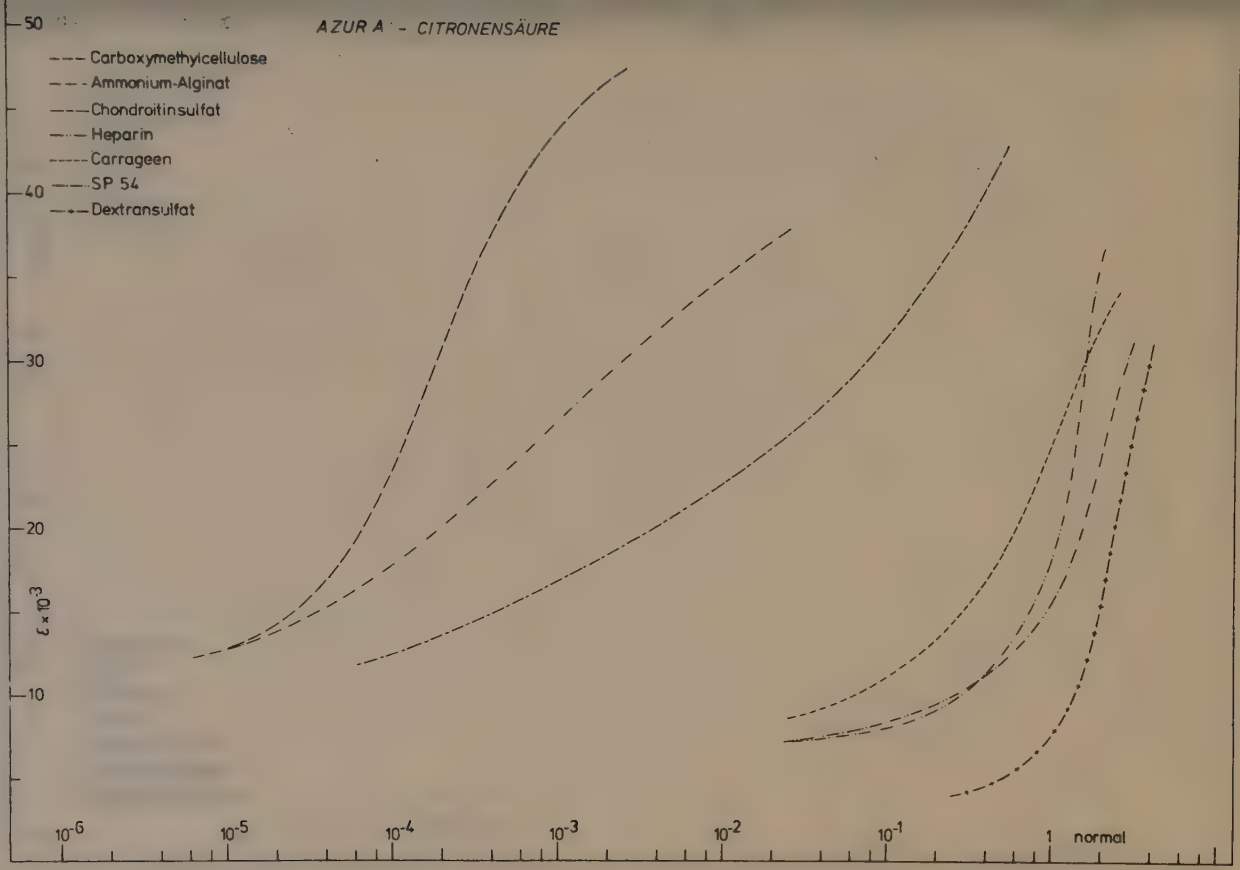


Abb. 24. (Legende s. Abb. 20).

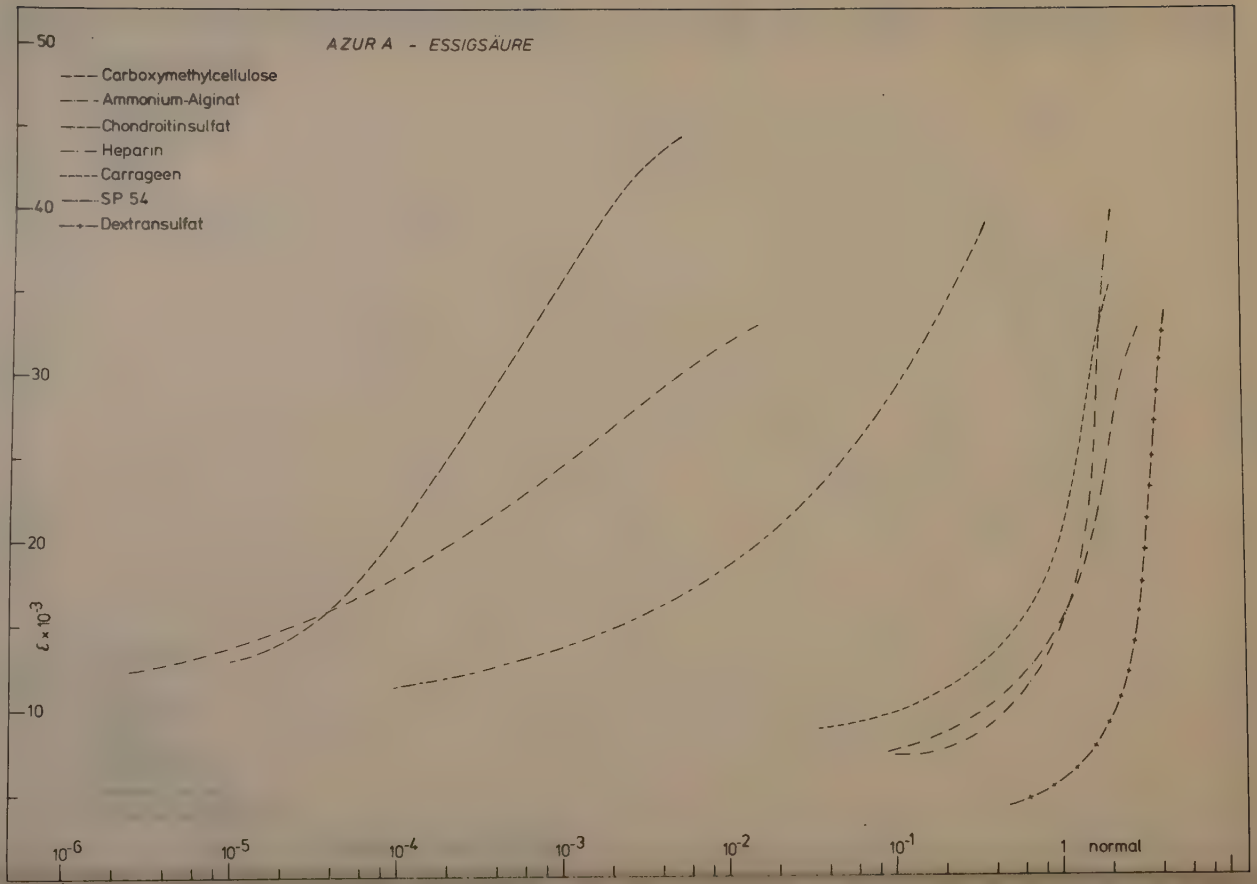


Abb. 25. (Legende s. Abb. 20).

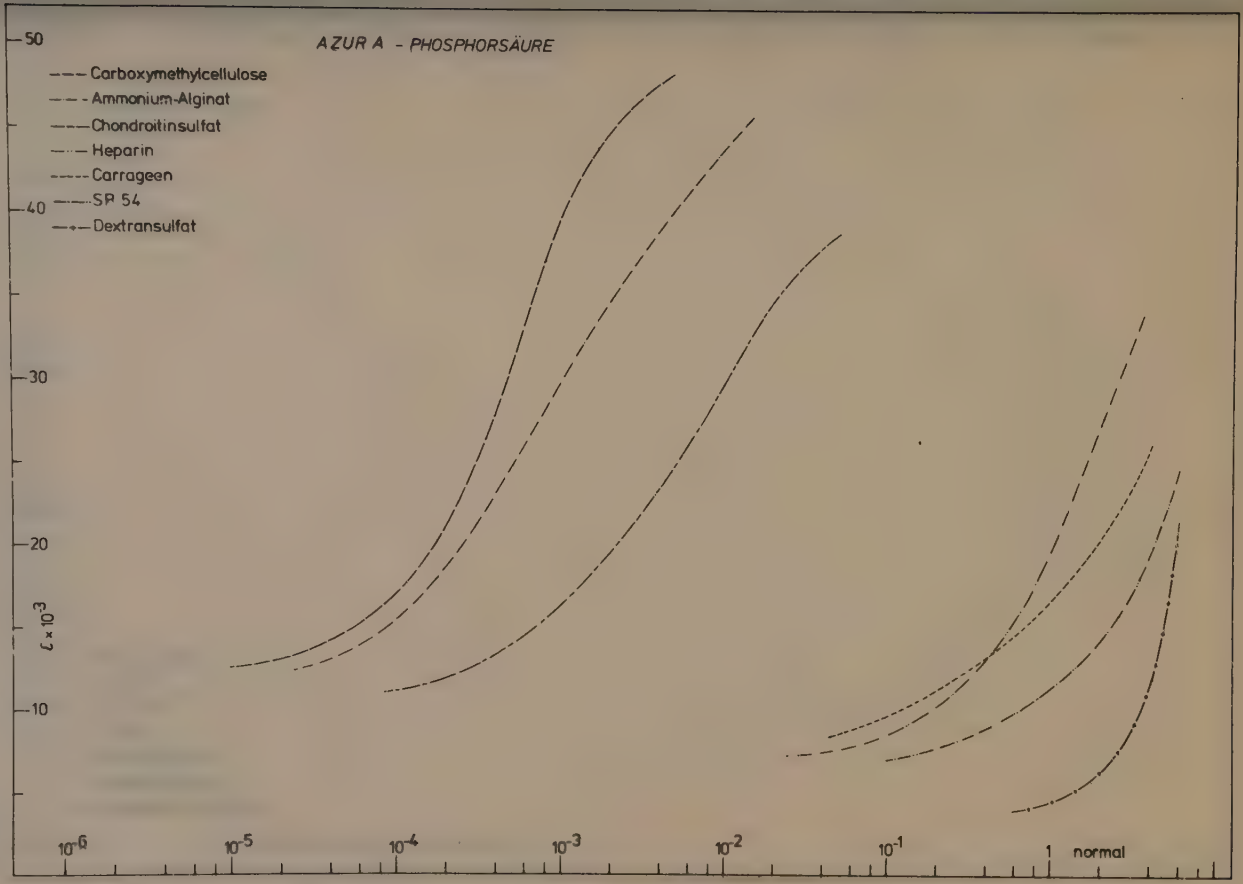


Abb. 26. (Legende s. Abb. 20).

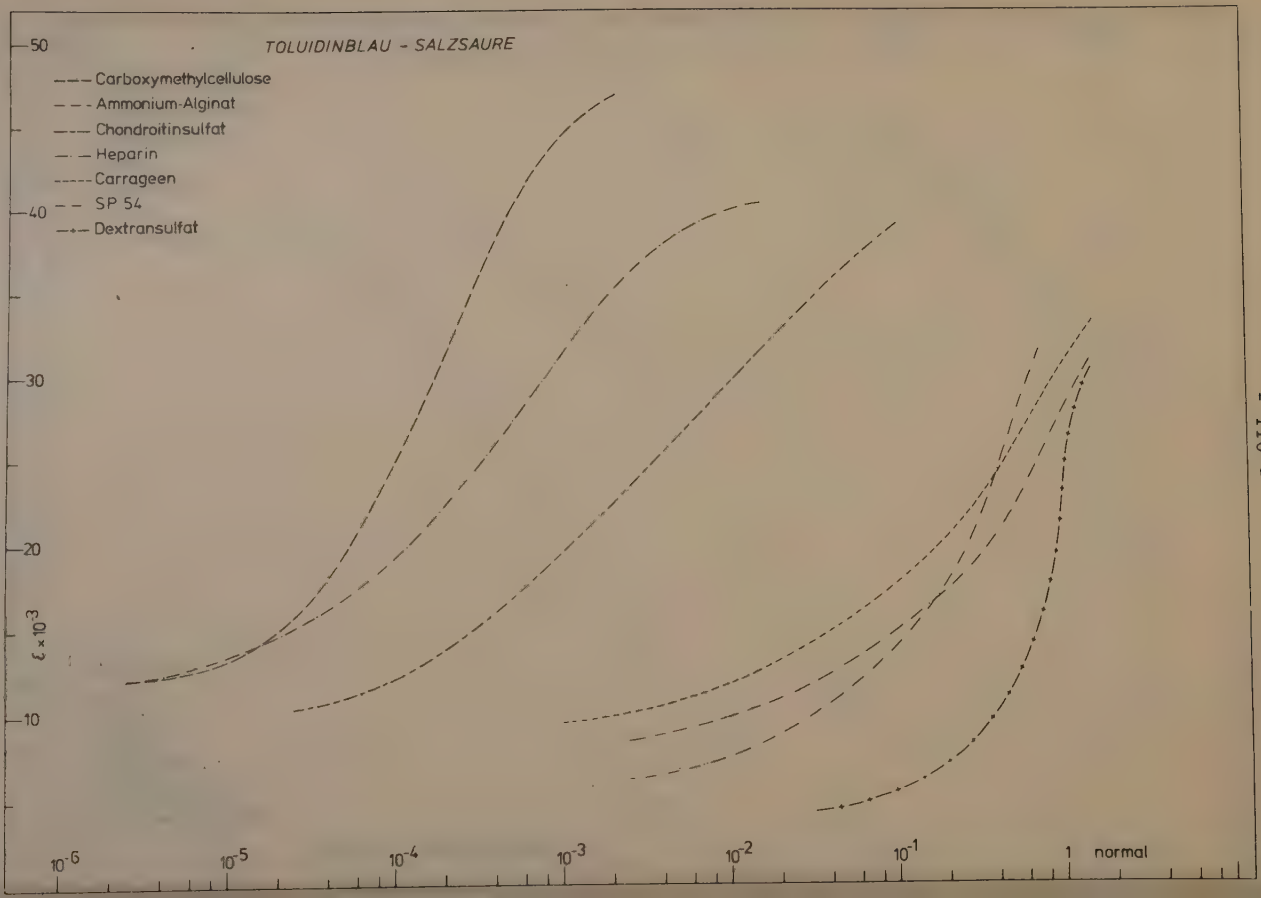


Abb. 27. Anstieg der orthochromatischen Bande von Toluidinblau bei Zerstörung verschiedener metachromatischer Verbindungen durch steigende Konzentration von Säure.

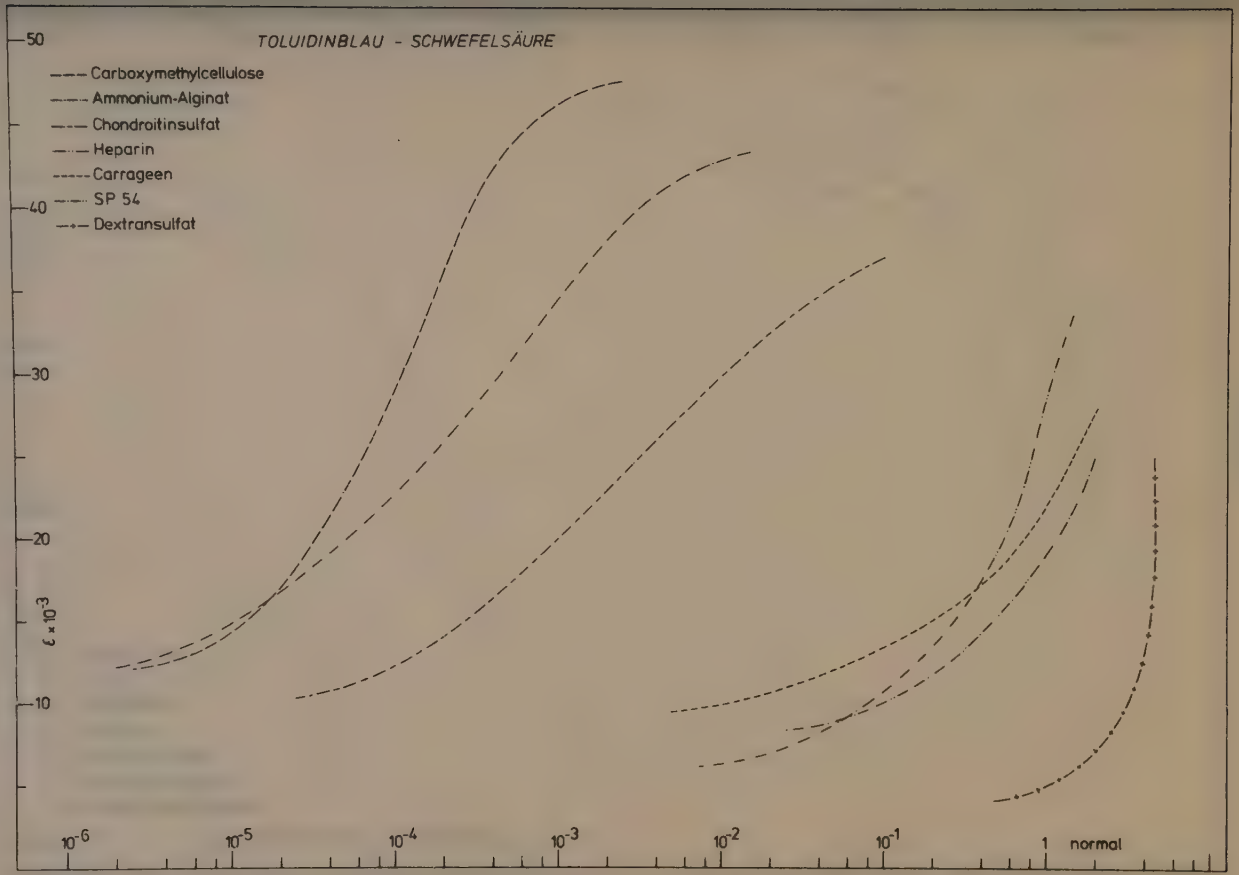


Abb. 28. (Legende s. Abb. 27).

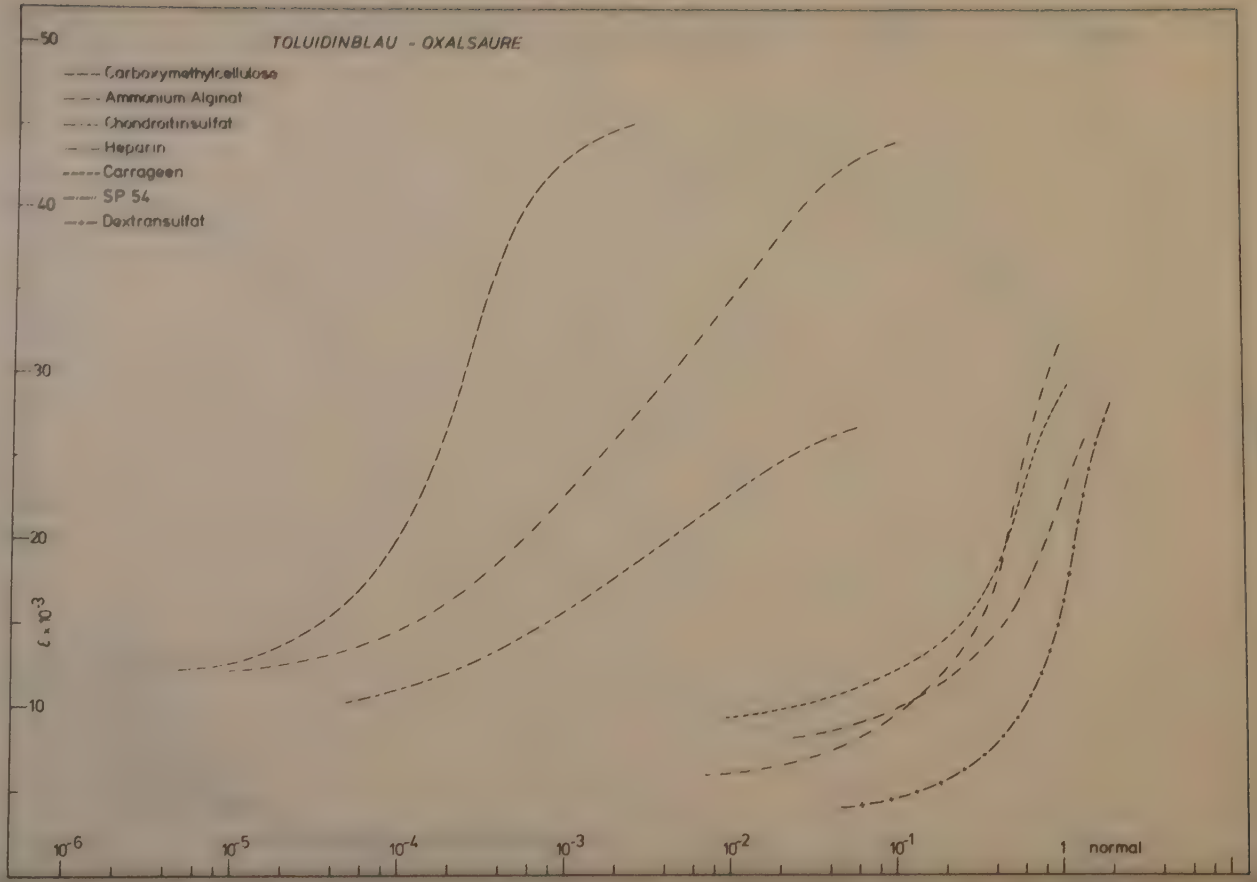


Abb. 29. (Legende s. Abb. 27).

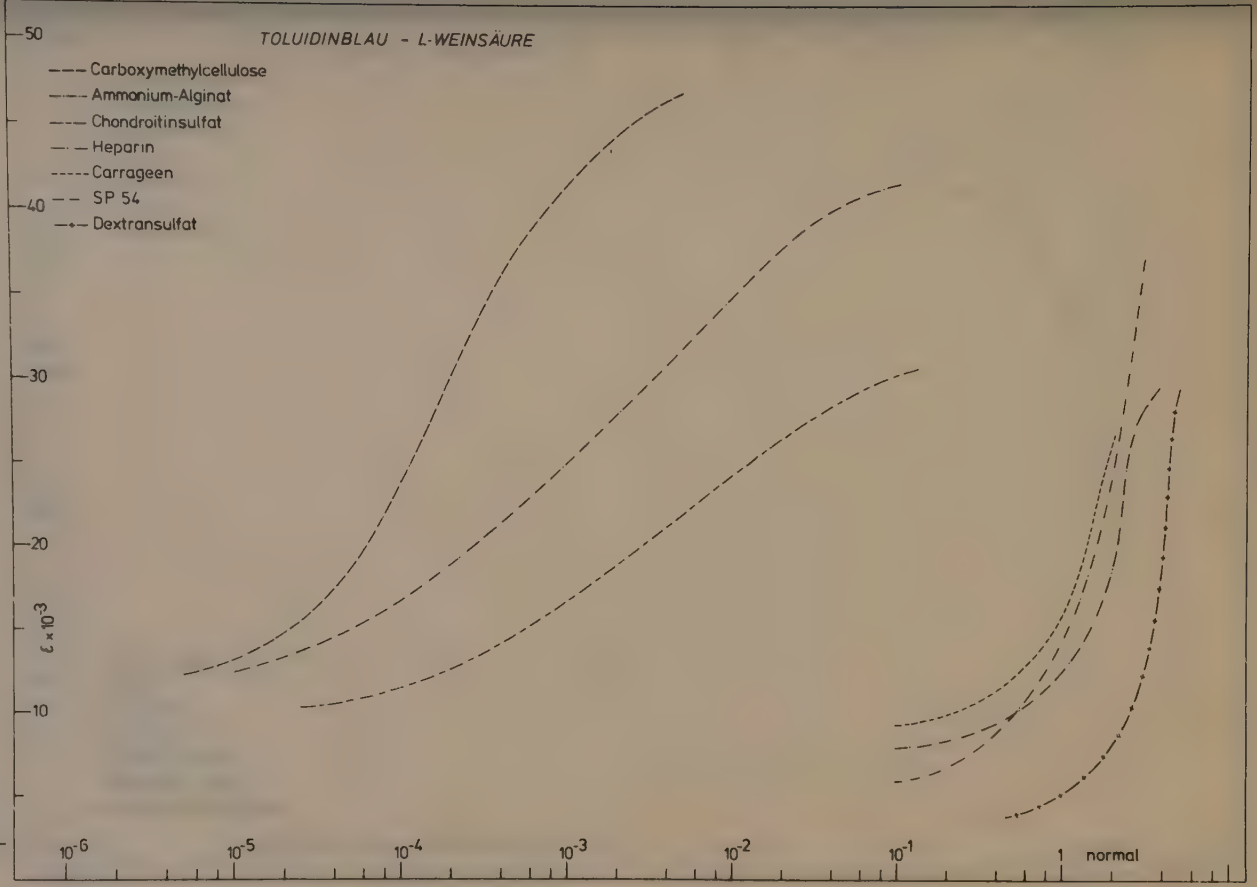


Abb. 30. (Legende s. Abb. 27).

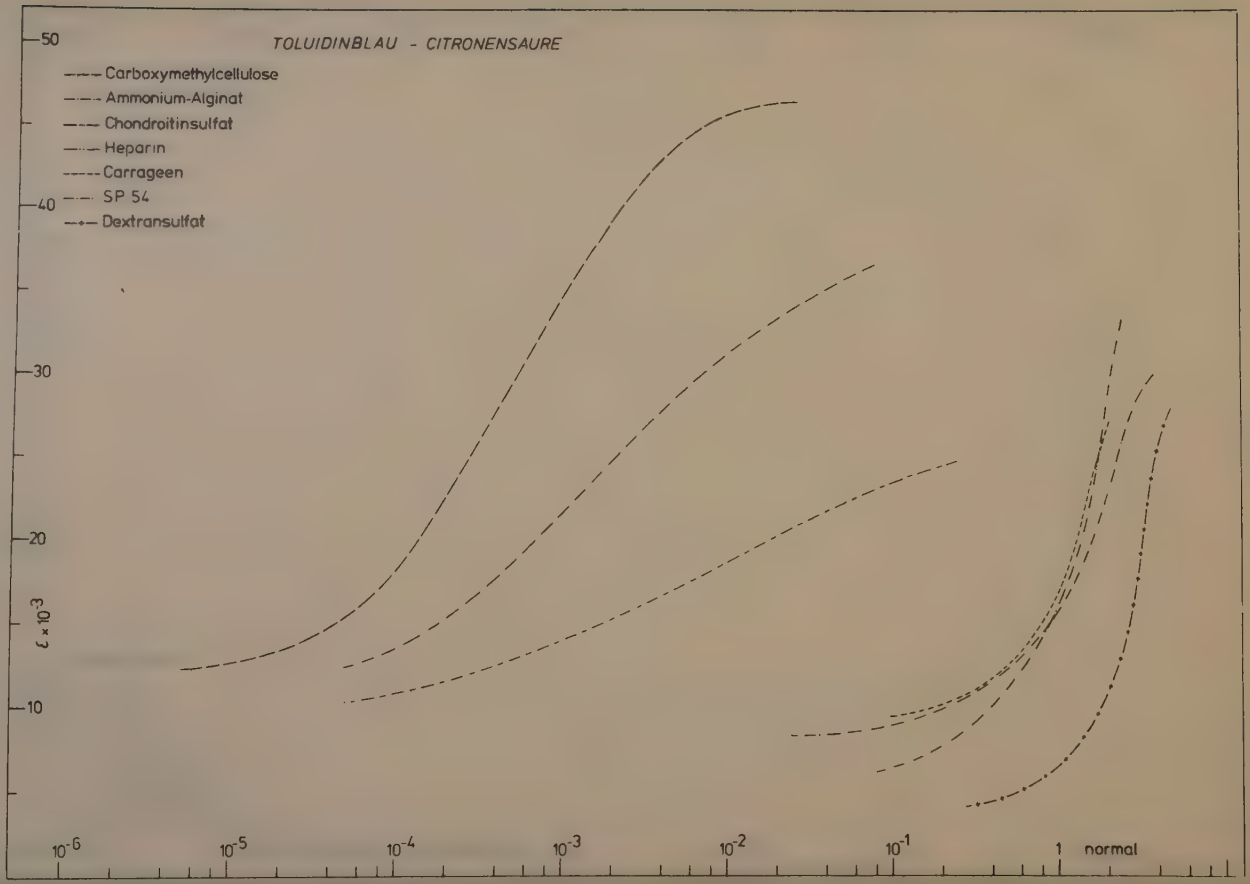


Abb. 31. (Legende s. Abb. 27).

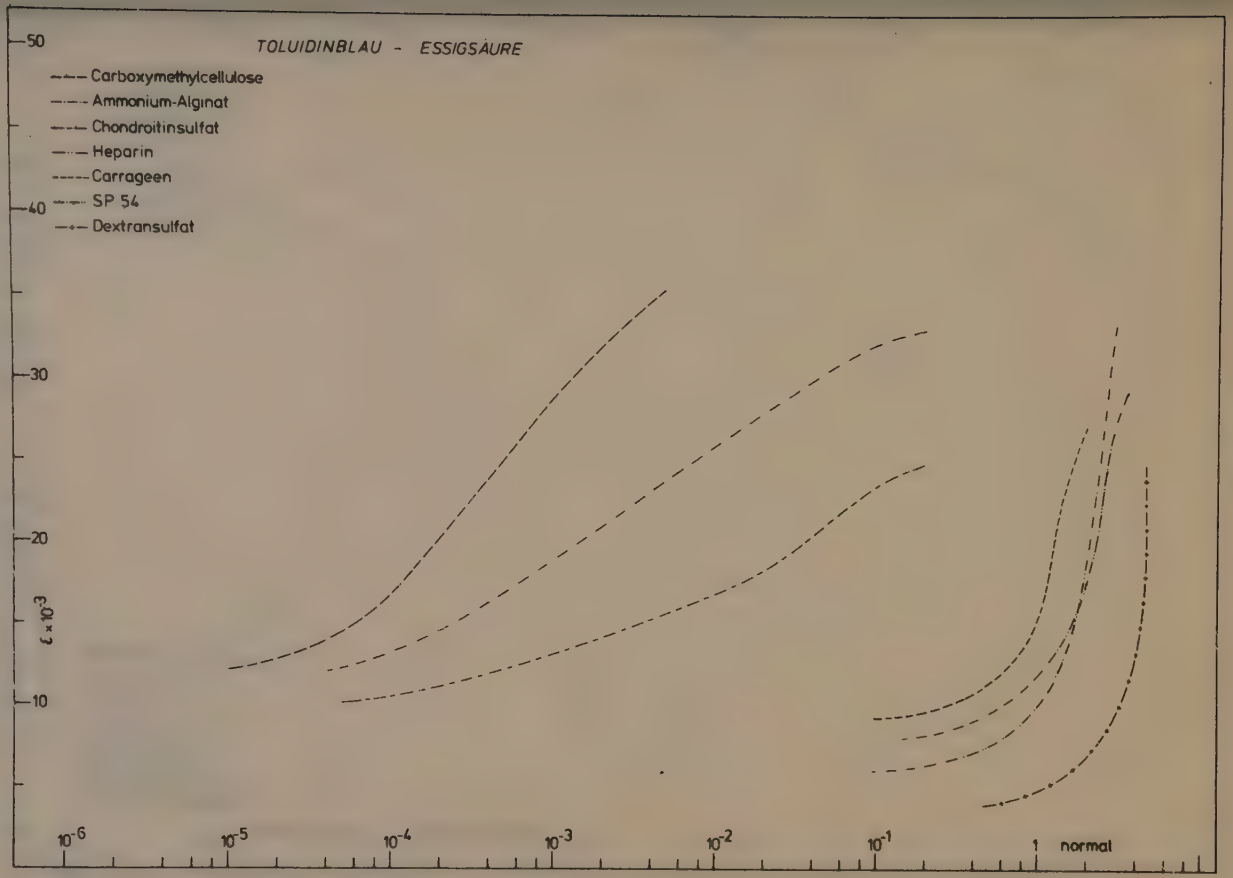


Abb. 32. (Legende s. Abb. 27).

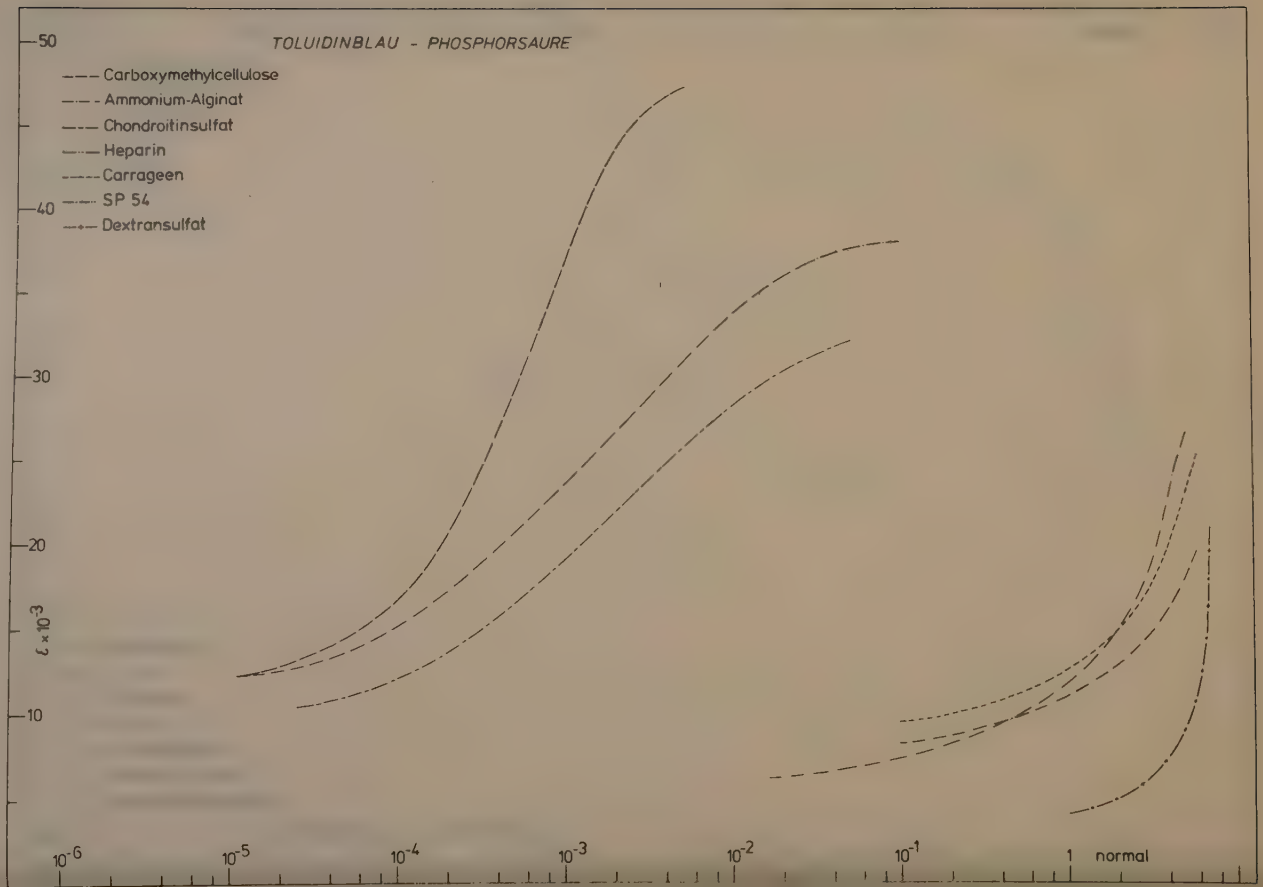


Abb. 33. (Legende s. Abb. 27).

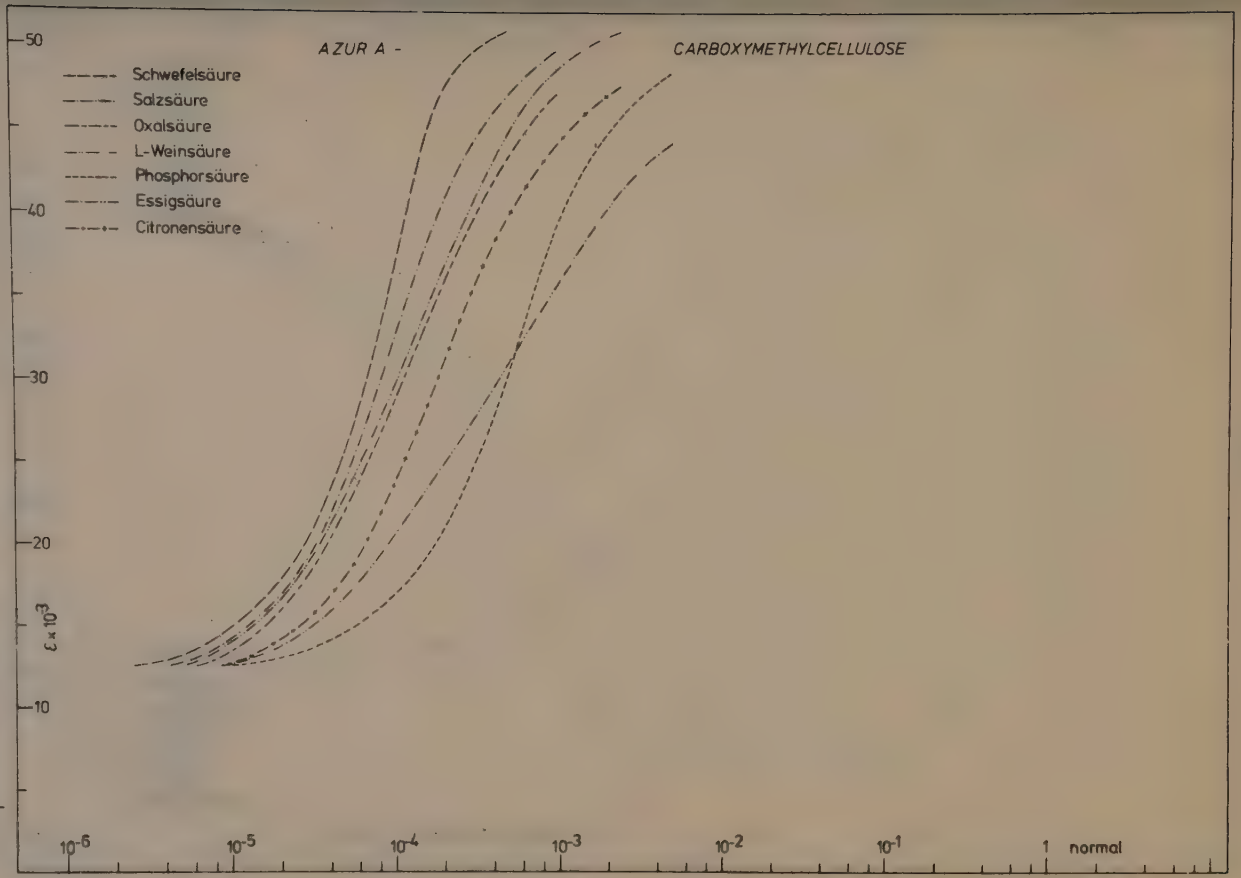


Abb. 34. Anstieg der orthochromatischen Bande von Azur A bei Zerstörung der Metachromasie durch steigende Konzentration verschiedener Säuren.

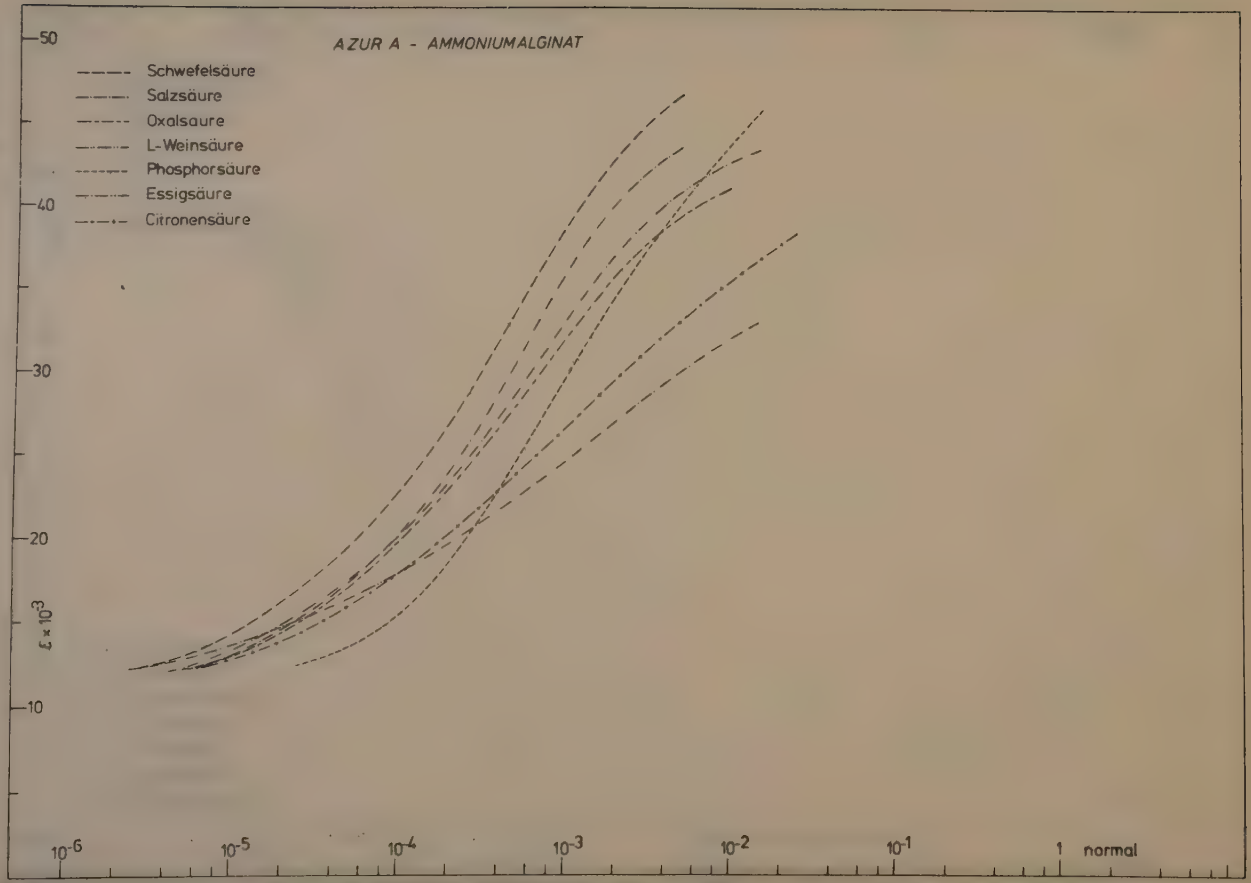


Abb. 35. (Legende s. Abb. 34).

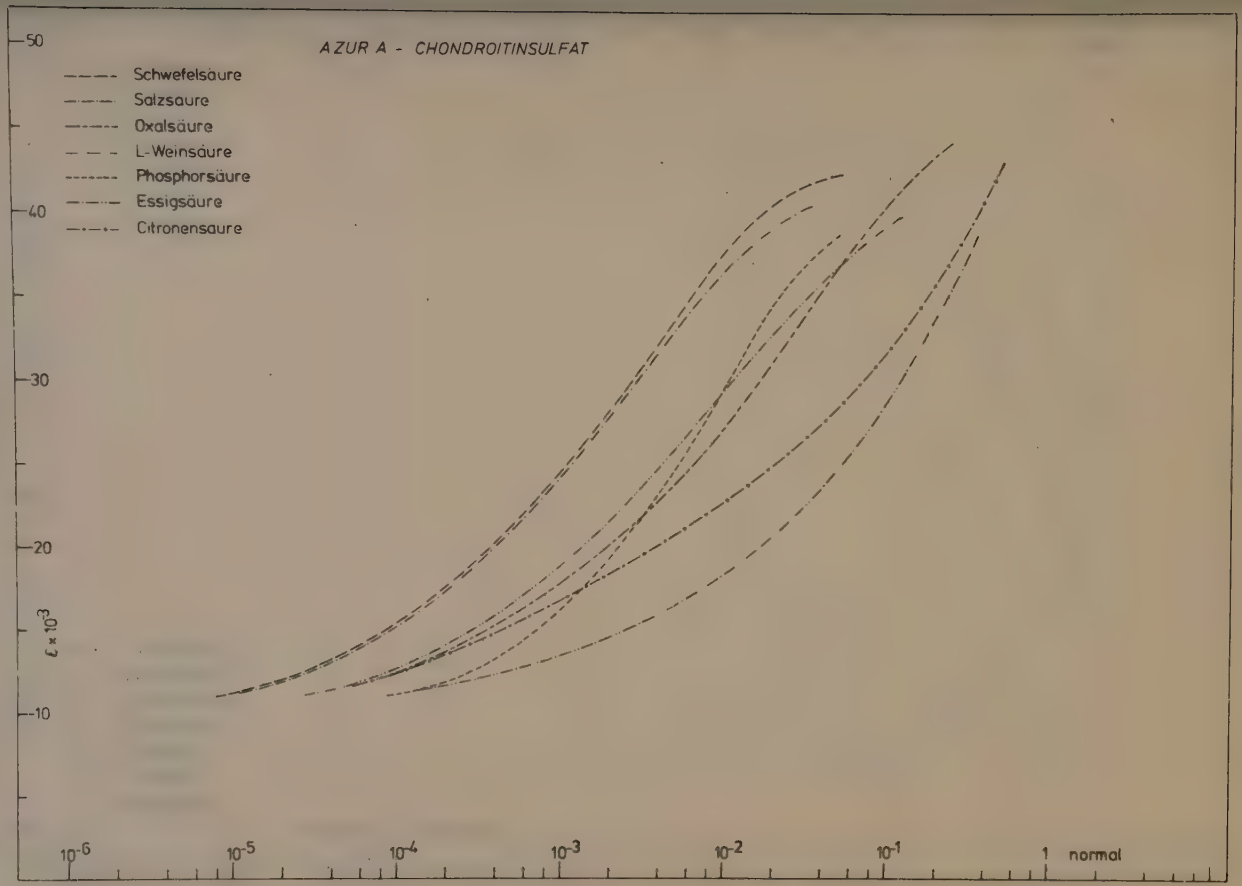
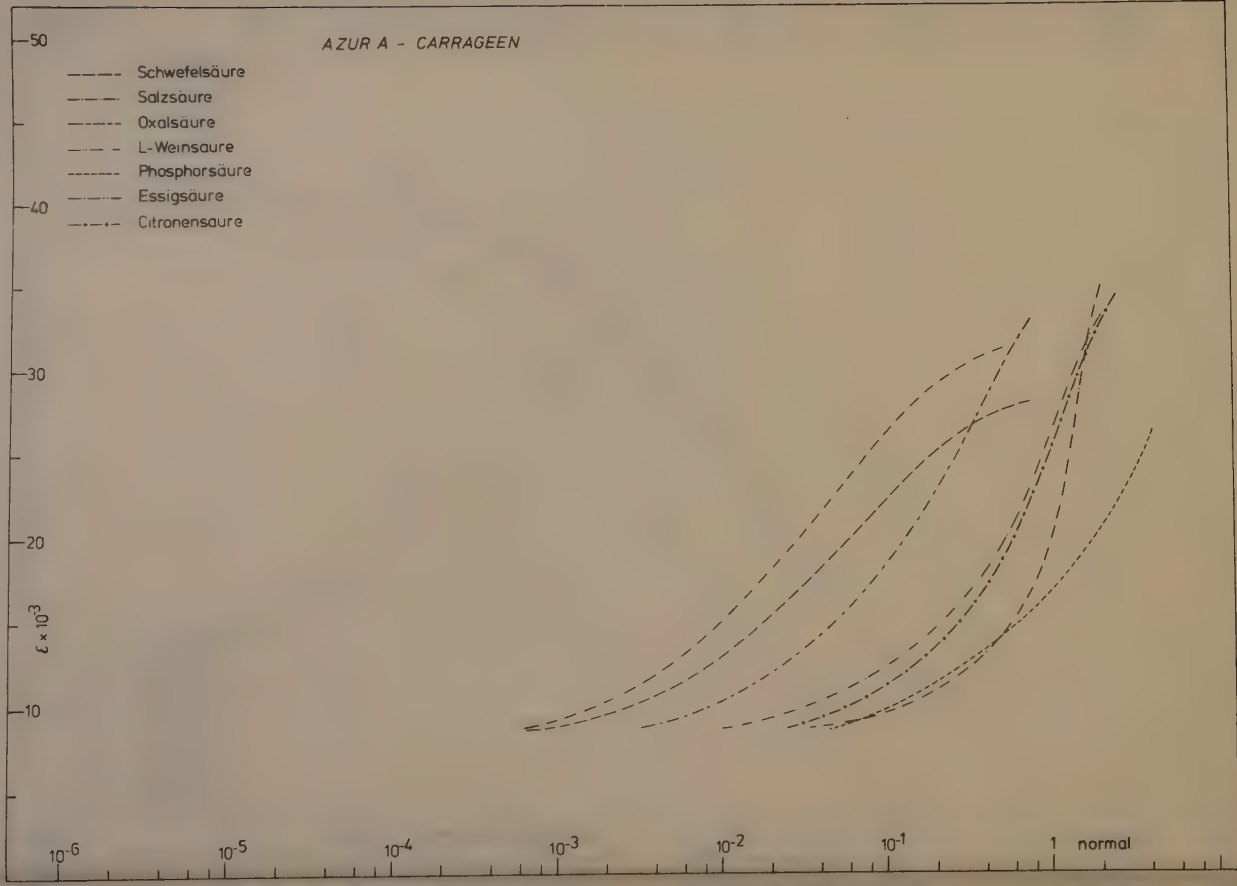


Abb. 36. (Legende s. Abb. 34).



bb. 37.(Legen-
e s. Abb. 34).

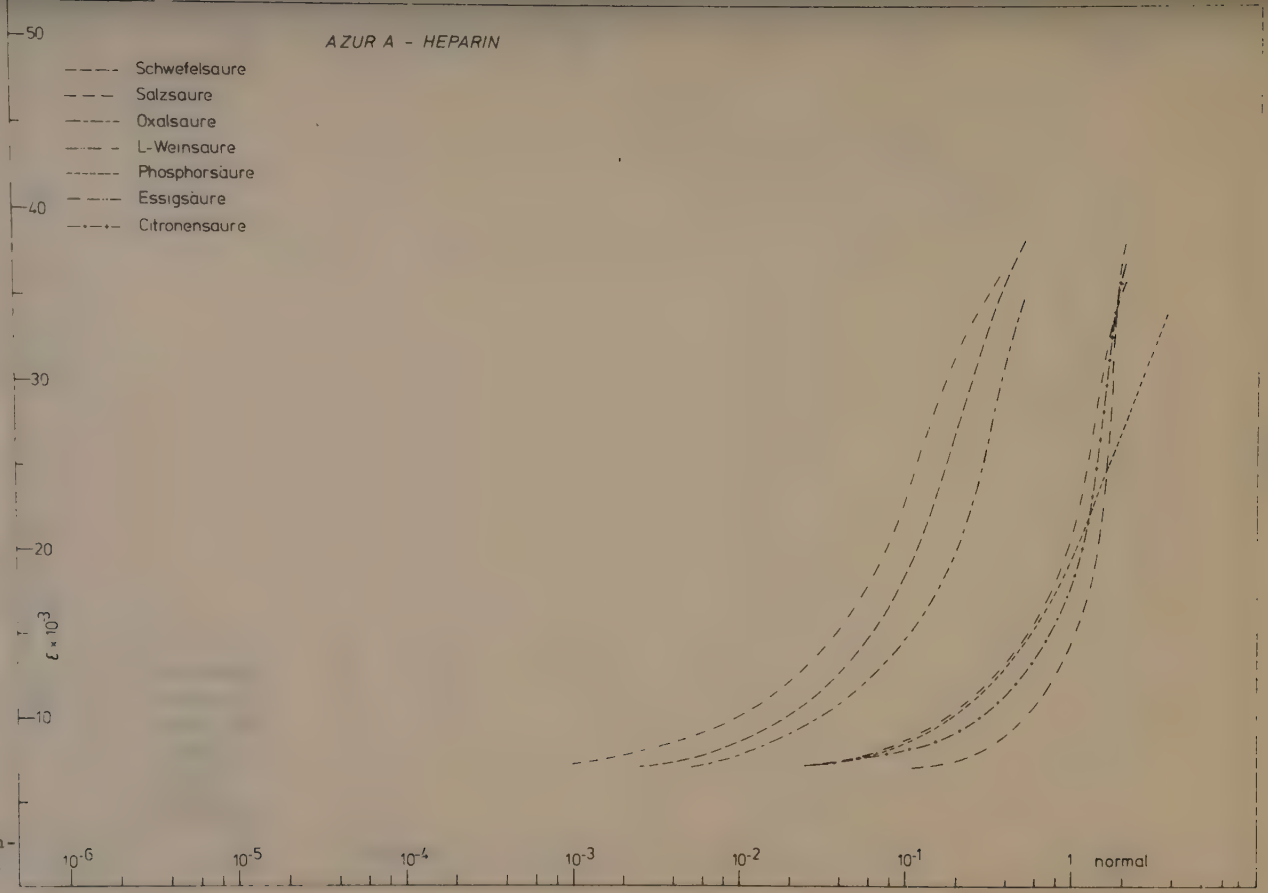


Abb. 38. (Legende s. Abb. 34).

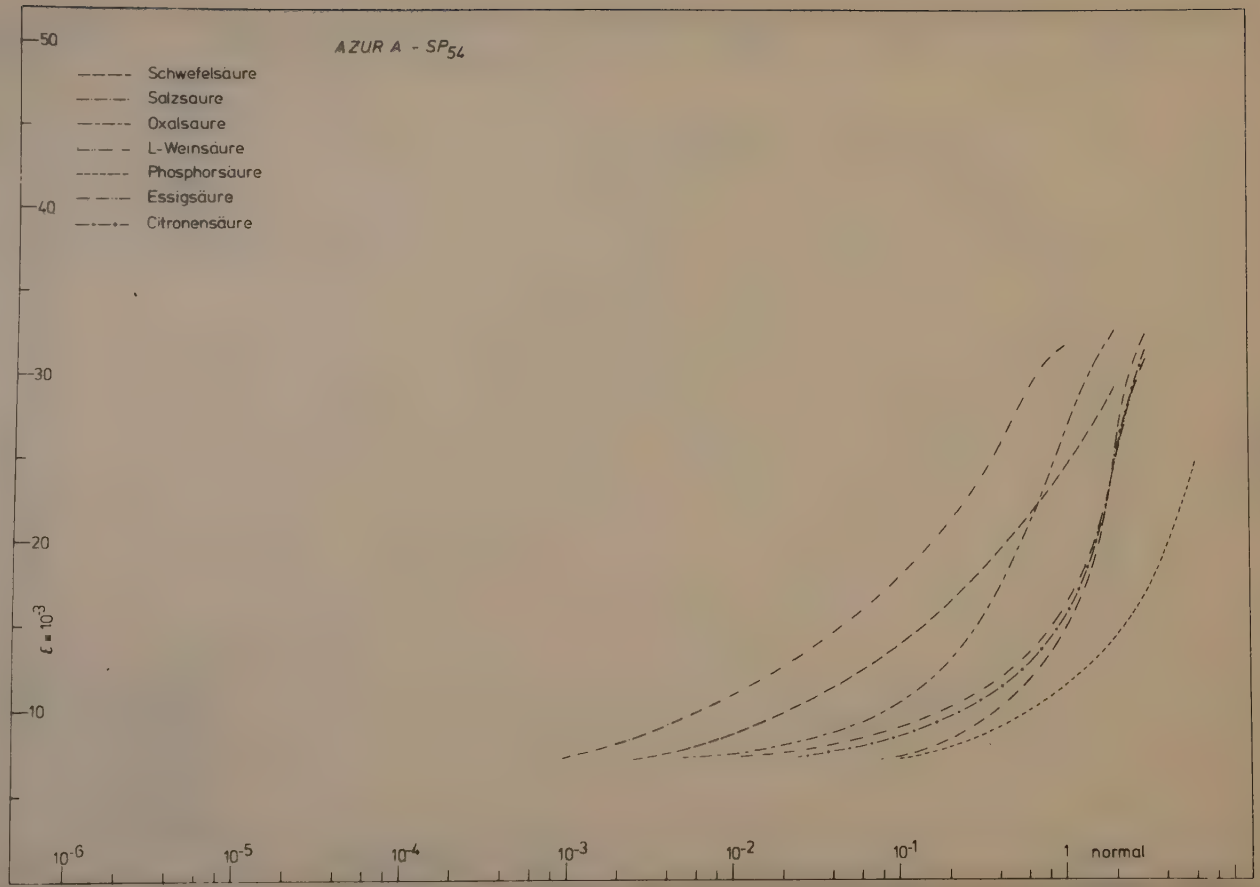


Abb. 39. (Legende s. Abb. 34).

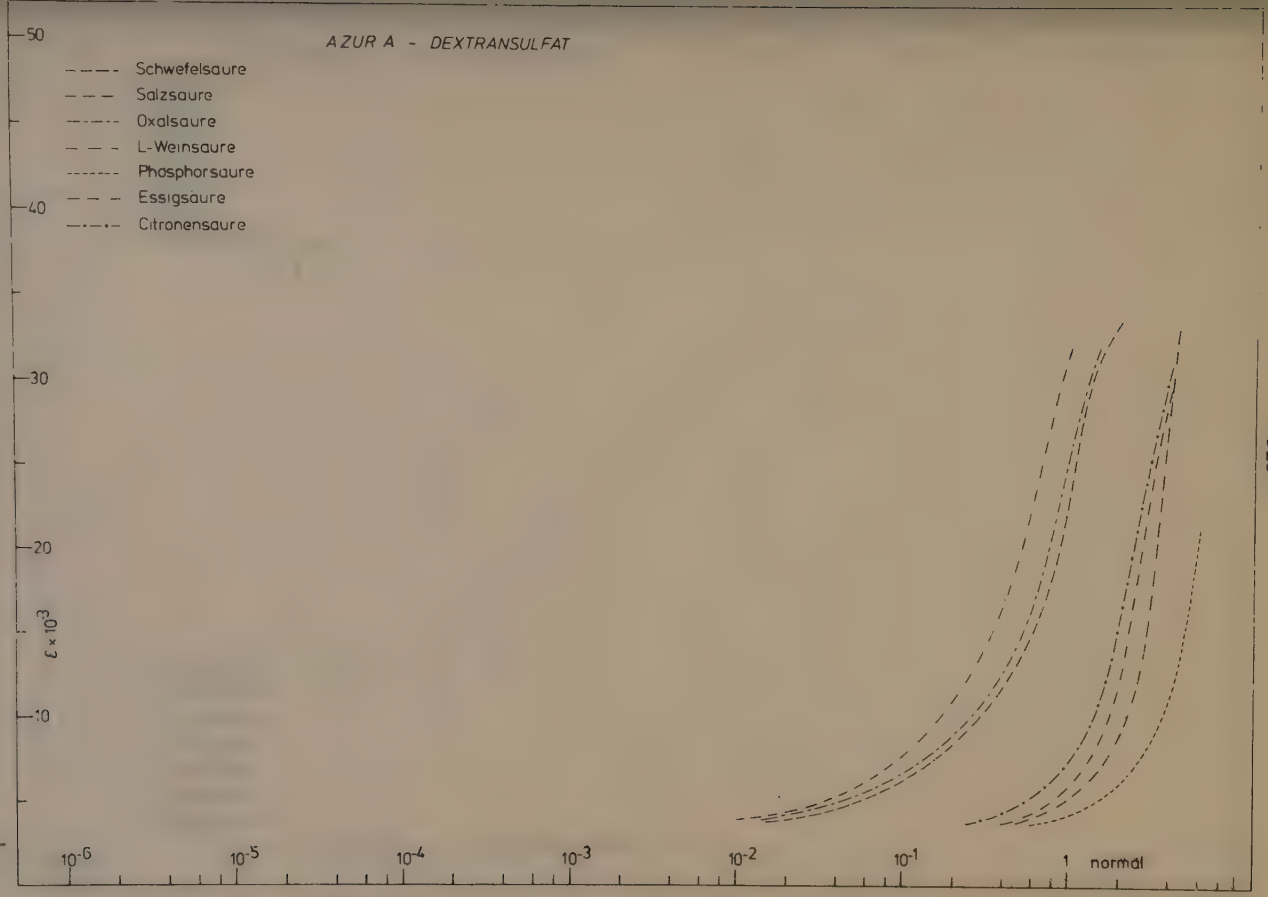


Abb. 40. (Legende s. Abb. 34).

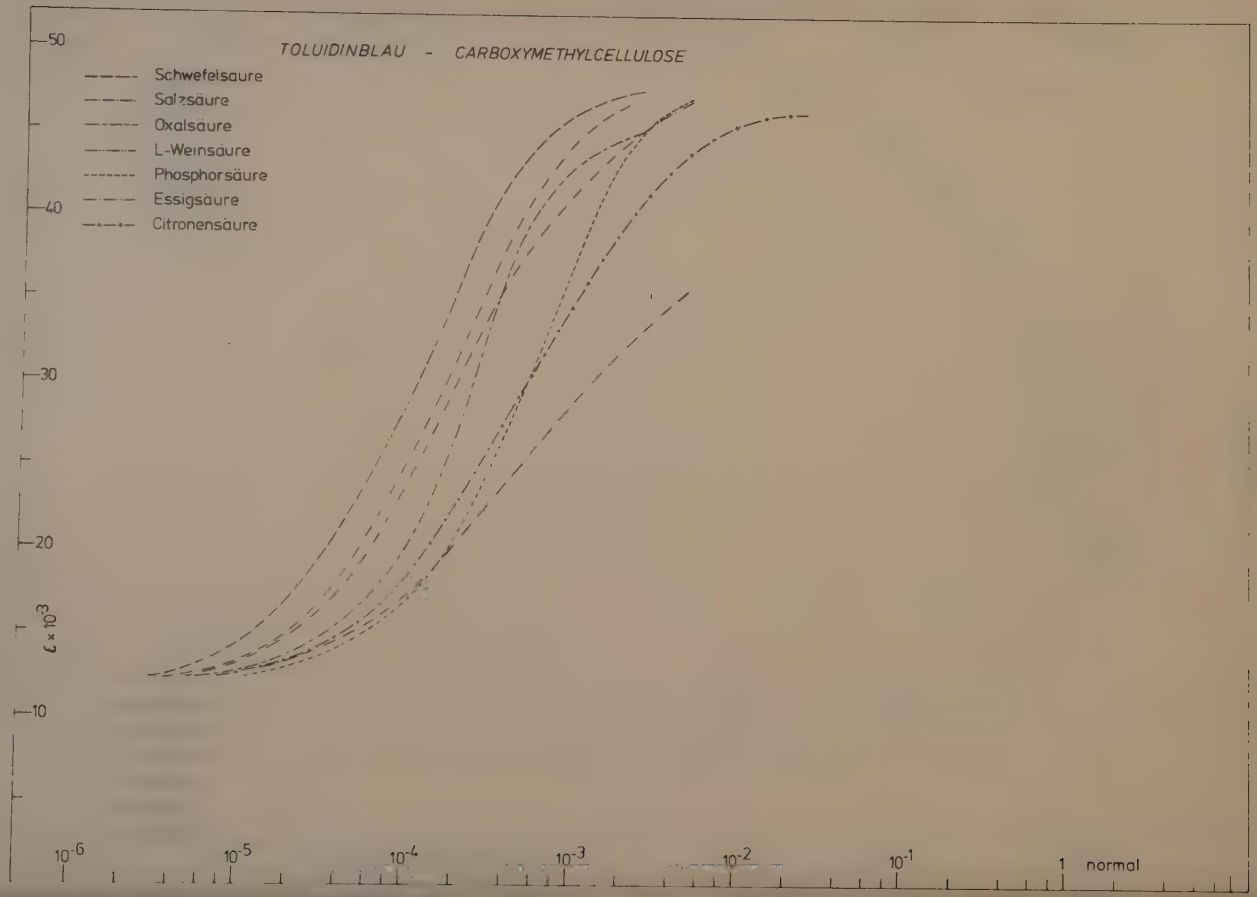


Abb. 41. Anstieg der orthochromatischen Bande von Toluidinblau bei Zerstörung der Metachromasie durch steigende Konzentration verschiedener Säuren.

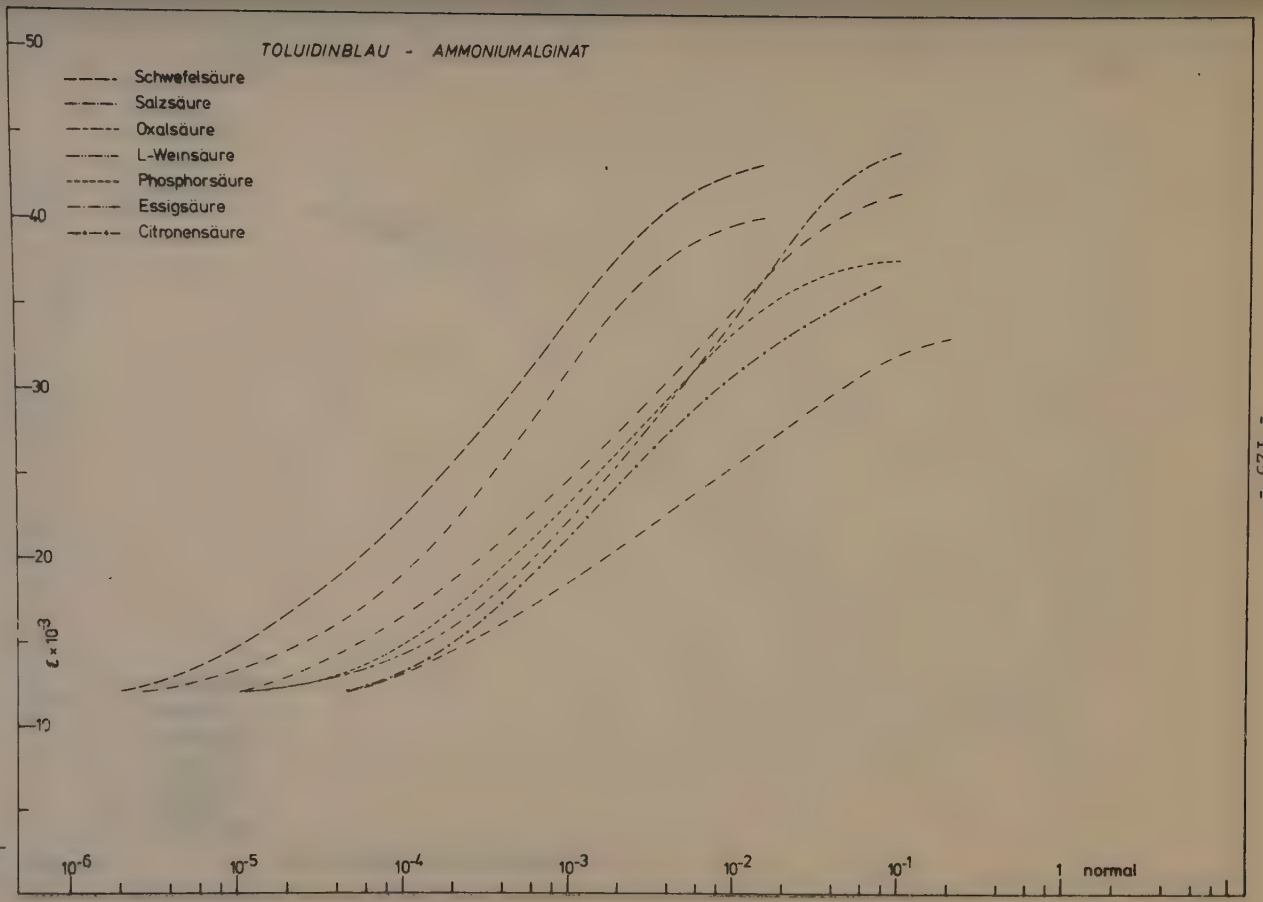


Abb. 42. (Legende s. Abb. 41).

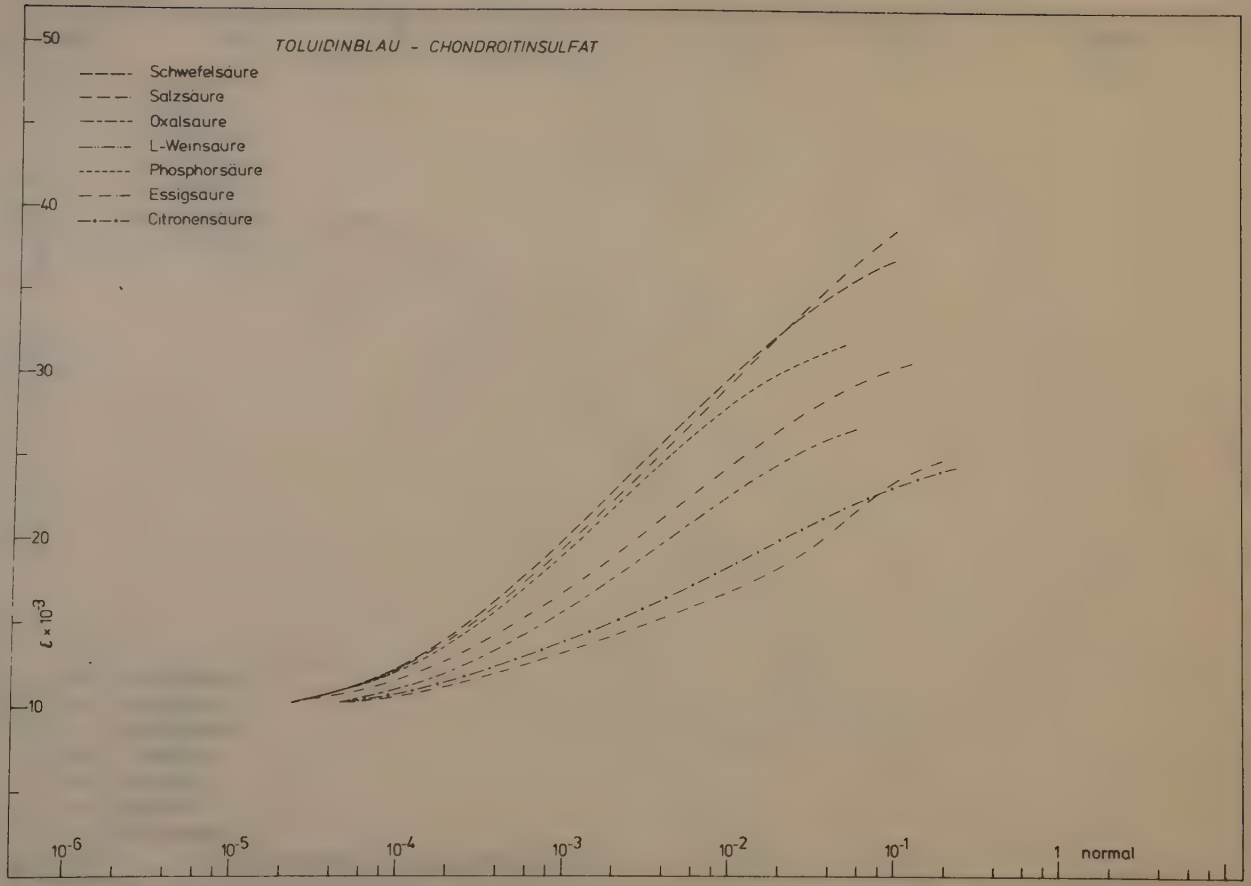


Abb. 43. (Legende s. Abb. 41).

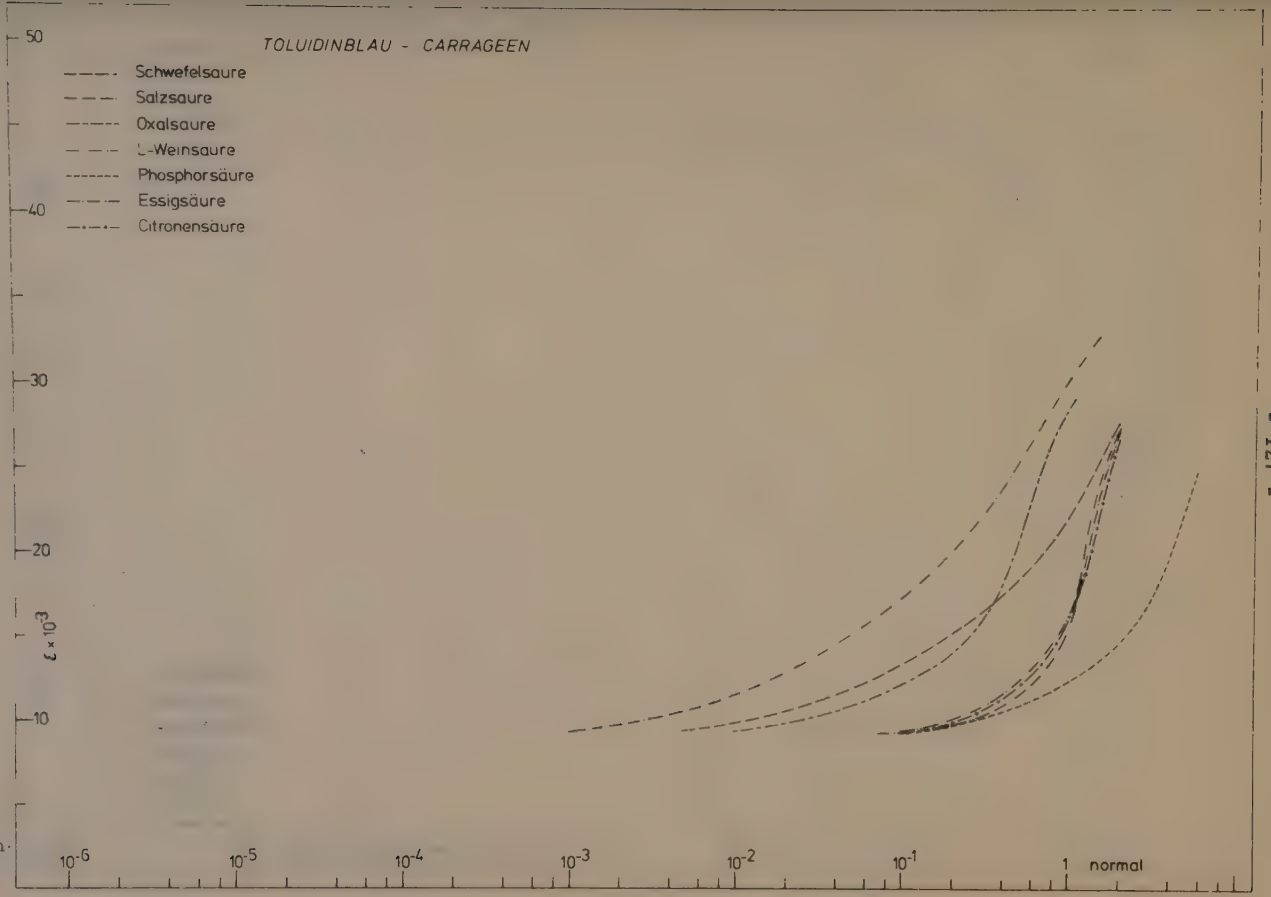


Abb. 44. (Legende s. Abb. 41).

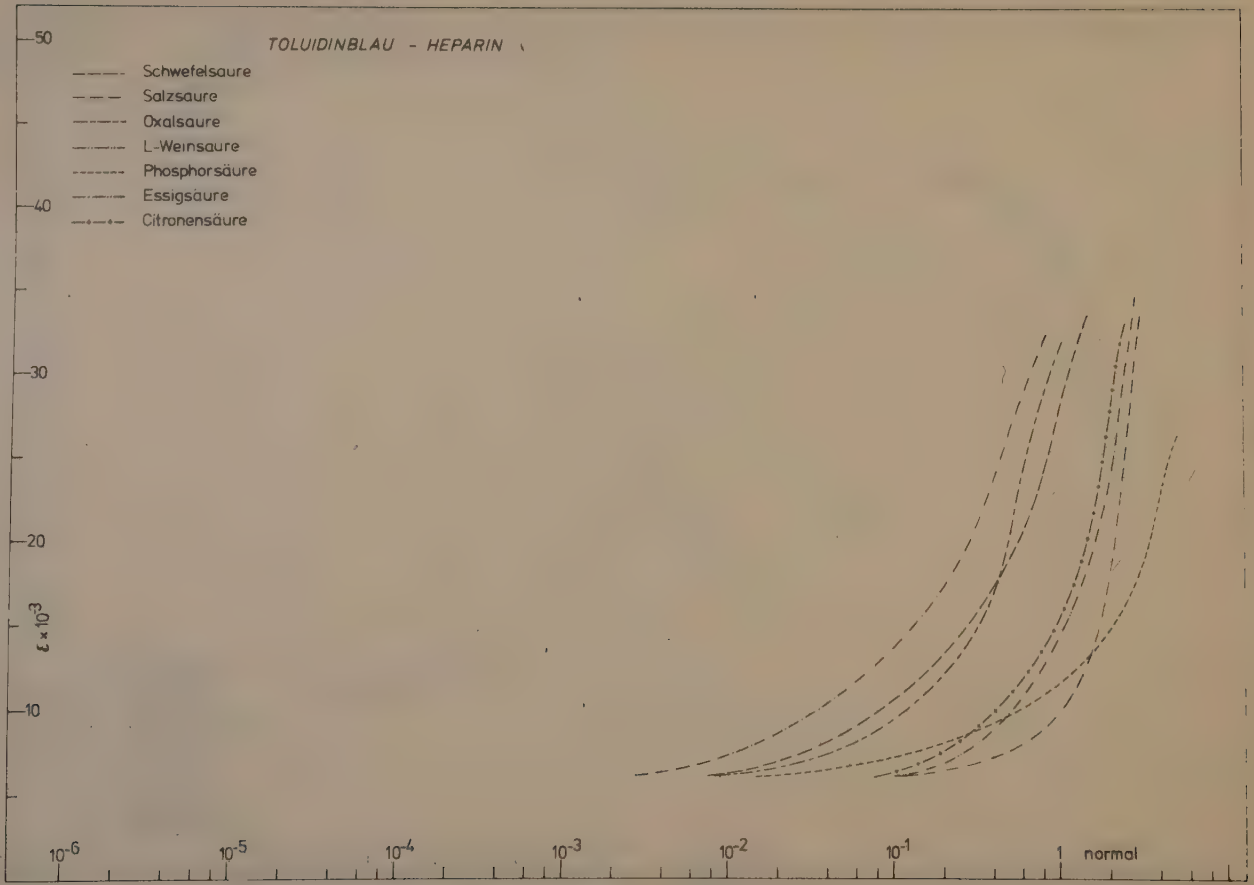


Abb. 45. (Legende s. Abb. 41).

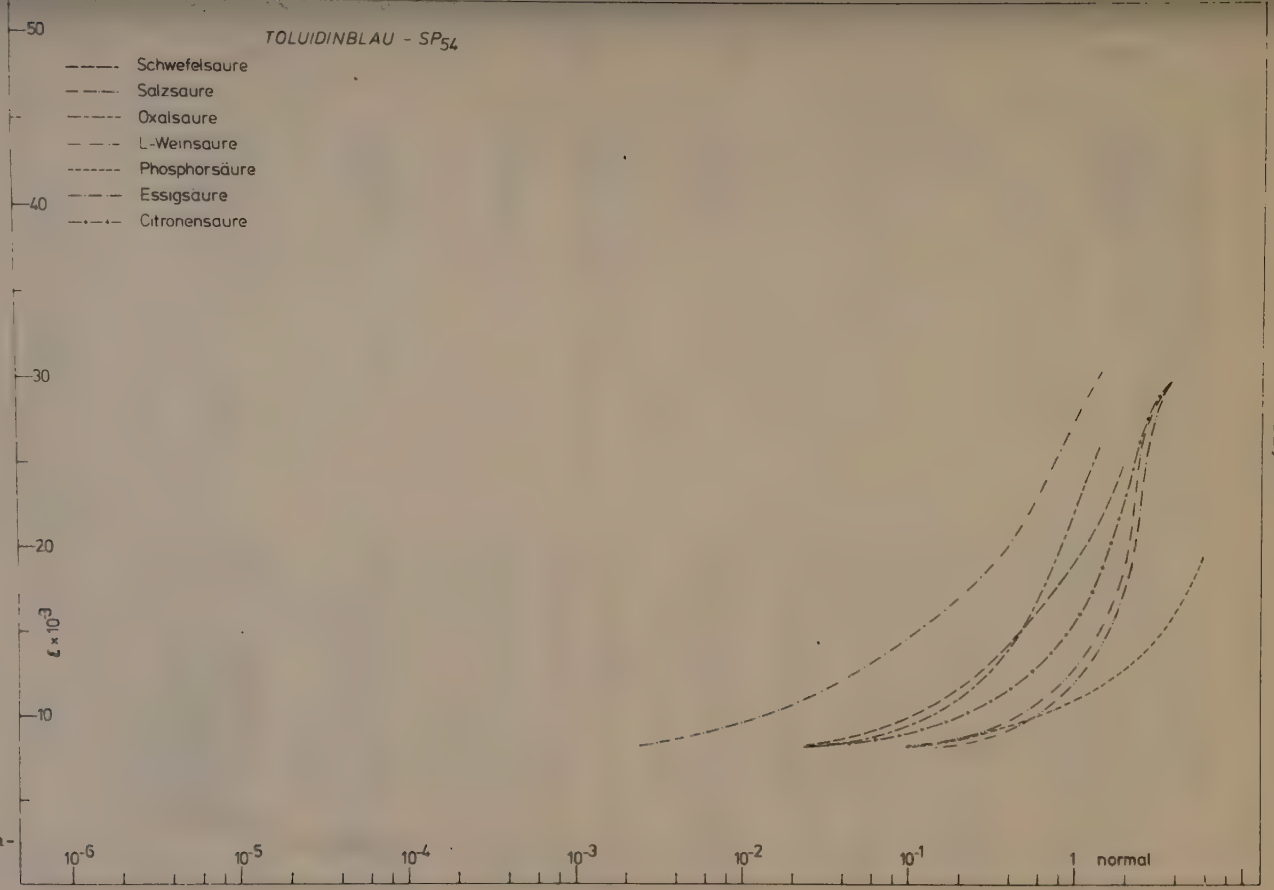


Abb. 46. (Legende s. Abb. 41).

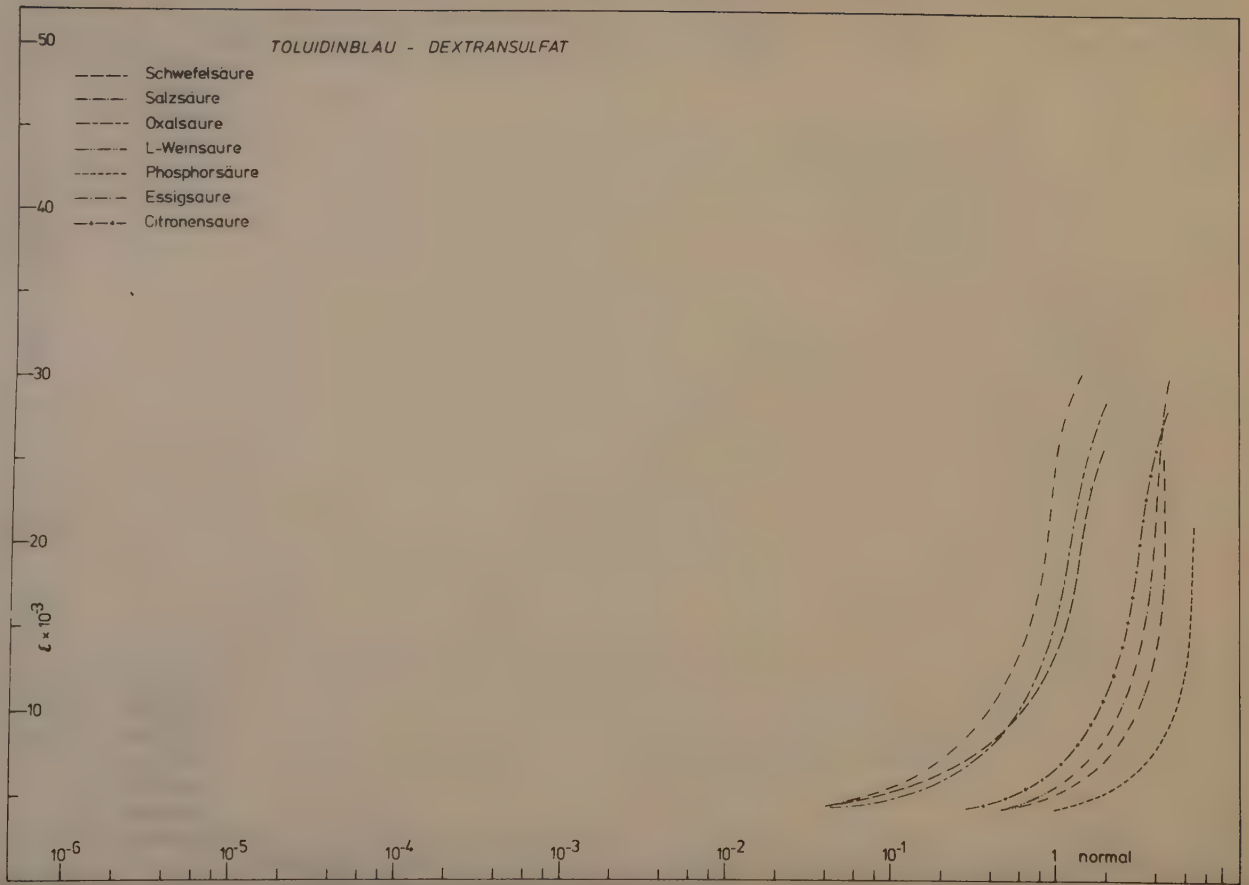


Abb. 47. (Legende s. Abb. 41).

7. Literaturverzeichnis

APPEL, W. und ZANKER, V. : Über die Bildung reversibler Assoziate des Akridinorange - Metachromasie durch Heparin. Z. Naturforsch. 13b 126-134 (1958).

ARNOLD, M. : Modellversuche zur Analyse metachromotroper Substanzen. Histochemie 6 1-7 (1966).

BALAZS, E.A. and SZIRMAI, J.A. : Quantitative determination of cationic dyebinding in connective tissue. J. Histochem. a. Cytochem. 6 278-289 (1958a).

BALAZS, E.A. and SZIRMAI, J.A. : Dyebinding and mucopolysaccharide content in connective tissue. J. Histochem. a. Cytochem. 6 416-424 (1958b).

BANK, O. und BUNGENBERG DE JONG, H.G. : Untersuchungen über Metachromasie. Protoplasma 32 489-516 (1939).

BARTELS, P. : Spektralphotometrische Untersuchungen am Neutralrot. Z. physik. Chemie, N.F. 9 95-105 (1956).

BERGERON, J.A. and SINGER, M. : Metachromasy: An experimental and theoretical reevaluation. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4 433-457 (1958).

BOOIJ, H.L., DEIERKAUF, F.A. and HEGNAUER-VOGELENZANG, M. : Colloid chemical aspects of metachromasia. II. Metachromatic staining of lipid fractions from beef brains. Acta physiol. pharmacol. Neerl. 3 113-125 (1953).

BRADEN, A.W.H. : The reactions of isolated mucopolysaccharides to several histochemical tests.
Stain Technol. 30 19-26 (1955).

BUNGENBERG DE JONG, H.G., TEUNISSEN, P.H. : Negative, nicht amphotere Biokolloide als hochmolekulare Elektrolyte I.
Kolloidchem. Beihefte 47 254 (1938).

CASTIGLIONI, G. : Richerche sulla metachromasia in soluzioni ossiregolatrici. Osservazioni sulla colorazione metachromatica di alcuni costituenti della mucosa nasale.
Ann. Biol. norm. pat. I (3) 30-38 (1947a).

CASTIGLIONI, G. : La colorazione di metachromasia in soluzioni ossiregolatrici. Osservazioni sulla colorazione metachromatica di alcuni costituenti della mucosa nasale.
Arch. ital. Otol. 58 116-121 (1947b).

CASTIGLIONI, G. : L'enzima mucinolitico in istologia.
Biol. Lat. (Milano) 2 585-591 (1949/50).

CLEMENS, H.J. und TOEPFER, K. : Physikalisch-chemische Eigenschaften von kommerziellen Thiazinfarbstoffen.
1. Bestimmung des Farbstoffgehalts und der Löslichkeit in Wasser und Äthylalkohol.
Acta histochem. 31 117-125 (1968a).

CLEMENS, H.J. und TOEPFER, K. : Physikalisch-chemische Eigenschaften von kommerziellen Thiazinfarbstoffen.
2. Qualitative und quantitative Untersuchungen über die Verunreinigung der Farbstoffe und das "Umlösen" zum Erhalt eines höheren Reinheitsgrades.
Acta histochem. 31 126-134 (1968b).

CLEMENS, H.J. und TOEPFER, K. : Physikalisch-chemische Eigenschaften von kommerziellen Thiazinfarbstoffen.
3. Der Einfluß der Farbstoffe auf die Wasserstoffionen-Konzentration in gepufferten und ungepufferten wässrigen Lösungen.
Acta histochem. 31 135-145 (1968c).

CORNIL, V. : Sur la dissociation du violet de méthylaniline et sa séparation en deux couleurs sous l'influence de certains tissus normaux et pathologiques, en particulier par les tissus en dégénérescence amyloide.
C. r. Acad. Sci. 80 1288 (1875).

EDLUND, T. and PERSSON, B.H. : The influence of polar solvents on the metachromatic reaction in vitro.
Experientia 5 210-211 (1949).

EHRLICH, P. : Beiträge zur Thoerie und Praxis der histologischen Färbung.
Doktorarbeit an der Universität Leipzig (1878).

EHRLICH, P. : Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukocythen.
Arch. Anat. Physiol.
3 166 (1879).

EPSTEIN, L.F., KARUSH, F. and RABINOWITCH, E. : A spectrophotometric study of thionin.
J. Opt. Soc. Amer.
31 77-84 (1941).

FRENCH, J.E. and BENDITT, E.P. : The histochemistry of connective tissue.
II. The effect of protein on the selective staining of mucopolysaccharides by basic dyes.
J. Histochem. a. Cytochem.
1 321-325 (1953).

FUNK, E. und TOEPFER, K. : Die metachromatische Reaktion in vitro; der Einfluß von anorganischen und organischen Säuren. Acta histochem. Suppl. (im Druck) (1971) XV. Symposion der Ges. für Histochemie, 8. - 12.9.1971 in Düsseldorf.

GRAUMANN, W. : Bestimmung der "Stärke der Metachromotropie". Verh. 6. Sympos. Arbeitsgem. für Histochemie, Kiel 1959 Acta histochem. Suppl. II 217-220 (1959).

GRAUMANN, W. : "Stärke der Metachromotropie". Eine Meßgröße zur histochemischen Charakterisierung schleimbildender Drüsenzellen. Histochemie 2 244-254 (1961).

GRAUMANN, W., ARNOLD, M. und GLEISSNER, U. : Histologische und spektralphotometrische Untersuchungen zur Bestimmung der "Stärke der Metachromotropie". Acta histochem. 23 276-287 (1966).

GRAUMANN, W. und MUSSO, H. : Histologische Prüfung der metachromogenen Wirksamkeit verschiedener Toluidinblau- und Azur A-Präparate. Histochemie 1 196-205 (1959).

HAMERMAN, D.J. and SCHUBERT, M. : A quantitative study of metachromasy in synovial fluid and mucin. J. Gen. physiol. 37 291-300 (1953).

HANSEN, F.C.C. : Über die Ursachen der metachromatischen Färbung bei gewissen basischen Farbstoffen. Z. wiss. Mikrosk. 25 144-153 (1908).

HARMS, H. : Handbuch der Farbstoffe für die Mikroskopie. Staufen-Verlag, Kamp-Lintfort (1959 - 1965).

HESCHL, R. : Eine hübsche a vista-Reaktion auf amyloid degenerierte Gewebe. Wien. med. Wschr. 25 714-715 (1875).

HOLMES, W.C. : The mechanism of stain action with basic dyes. Stain Technol. 1 98-102 (1926).

HOLMES, W.C. : The chemical nature of Metachromasy. Stain Technol. 1 116-122 (1926).

HOROBIN, R.W. : The impurities of biological dyes: their detection, removal, occurrence and histological significance - a review. Histochemical Journal 1 231-265 (1969).

HOROBIN, R.W. : Dextrin and salt as impurities of histological dyes: estimation and removal. Histochemie 22 39-44 (1970).

HOROBIN, R.W. and MURGATROYD, L.B. : A comparison of rapid electrophoretic and chromatographic methods for the investigation of common histological dyes. Histochemie 11 141-151 (1967).

HOROBIN, R.W. and MURGATROYD, L.B. : The staining of glycogen with Best's Carmine and similar hydrogen bonding dyes. A mechanistic study. Histochemical Journal 3 1-9 (1971).

JÜRGENS, R. : Eine neue Reaktion auf Amyloidkörper. Virchow's Arch. 65 189-196 (1875).

KALTOFEN, R., SCHUMANN, K. und ZIEMANN, J. : Tabellenbuch Chemie Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie. Leipzig, 1962, 3.Aufl.

KAWAMOTO, M. und GRAUMANN, W. : Histologische und spektralphotometrische Untersuchungen zur fluoreszenzmikroskopischen Bestimmung der "Stärke der Metachromotropie" mit Akridinorange. Acta histochem. 33 238-246 (1969).

KELLY, J.W. : Effects of x-ray and trypsin on the metachromasy of heparin-basic protein combinations. Biol. Bull. 101 223 (1951).

KELLY, J.W. : The metachromatic reaction In: Protoplasmatologia, Handbuch der Protoplasmaforschung. Hrsg.: L.V. HEILBRUNN und F. WEBER Springer-Verlag, Wien 1956, Bd. II, D_2.

KELLY, J.W. : The use of metachromasy in histology, cytology and histochemistry. Acta Histochem. Suppl. I 85-102 (1958).

KELLY, J.W., CHANG, L. and ROTHSTEIN, F. : Thermal analysis of polyanion metachromasy: effect of temperature on metachromatic solutions of nucleic acids and acid mucopolysaccharides. J. Histochem. Cytochem. 17 651-657 (1969).

KIESER, E. : Qualitative chemische Untersuchungen über den metachromatischen Effekt von Toluidinblau und Natronlauge.
Acta histochem. 32 135-141 (1969).

KOBLET, H. : Physikalische Begriffe in der klinischen Biochemie.
Thieme-Verlag, Stuttgart 1964.

KORTÜM, G. : Lehrbuch der Elektrochemie
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, 4.Aufl., 1970.

KORTÜM, G. : Das optische Verhalten gelöster Ionen und seine Bedeutung für die Struktur elektrolytischer Lösungen.
IV. Der Geltungsbereich des LAMBERT-BEER'schen Gesetzes in wässrigen Lösungen anorganischer Salze.
Z. physik. chem. Abt. B.
33 243-264 (1936).

KORTÜM, G. : Kolorimetrie, Photometrie und Spektrometrie.
In: Anleitungen für die chemische Laboratoriumspraxis.
Hrsg.: H. MAYER-KAUPP
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen 1962, Bd. 2, 4.Aufl.

KRAMER, H. and WINDRUM, A.M. : The metachromatic staining reaction.
J. Histochem. Cytochem.
3 227-237 (1955).

KUHN, H. : Aquantum-mechanical theory of light absorption of organic dyes and similar compounds.
J. chem. Physics
17 1198-1212 (1949).

LANDOLT-BÖRNSTEIN : Zahlenwerte und Funktionen. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959, Bd. II, Teil 6,1 6.Aufl.

LANDSMEER, J.M.F. : Some colloid chemical aspects of metachromasia. Influence of pH and salts on metachromatic phenomena evoced by toluidine blue in animal tissue. Acta Physiol. Pharmacol. Neerl. 2 112-128 (1951).

LANDSMEER, J.M.F. and GIEL, R. : Staining properties of brain tissue before and after treatment with potassium dichromate. J. Histochem. Cytochem. 4 69-78 (1956).

LANGEY, N.A. : In: Handbook of chemistry, 10th ed. McGraw-Hill Book Co., London, 1961.

LEVINE, A. and SCHUBERT, M. : Metachromasy of thiazine dyes produced by chondroitinsulphate. J. Am. Chem. Soc. 74 I 91-97 (1952).

LEWIS, G.N., GOLDSCHMID, O., NAGEL, T.T. and BIGELEISEN, J. : Dimeric and other forms of methylene blue: absorption and fluorescence of the pure monomer. Amer. Soc. 65, I 1150-1154 (1943).

LISON, L. : Sur la détermination du pH intracellulaire par les colorants vitaux indicateurs: l'erreur métachromatique. Protoplasma 24 453-465 (1935a).

LISON, L. : Études sur la métachromasie et colorants métachromatiques et substances chromotropes. Arch. biol. (Liège) 46 599-668 (1935b).

MANDAL, N.C., BISWAS, B.B. and PAL, M.K. : Metachromasia induced by Inositol-Hexa-Phosphate with Toluidine Blue. Histochemie 18 202-209 (1969).

MCKAY, R.B. and HILLSON, P.J. : Visible absorption spectra of some cationic dyes in solution. Effect of dye aggregation. Trans. Farad. Soc. 61 1787-1799 (1965).

MCKAY, R.B. and HILLSON, P.J. : Metachromatic behaviour of dyes in solution. Interpretation on the basis of interaction between dye ions and counter-ions. Trans. Farad. Soc. 61 1800-1810 (1965).

MCKAY, R.B. and HILLSON, P.J. : Metachromatic behaviour of dyes in solvents of low dielectric constant. Trans. Farad. Soc. 62 1439-1446 (1966).

MCKAY, R.B. and HILLSON, P.J. : Metachromatic behaviour of dyes in solvents of high dielectric constant: the anomaly of water. Trans. Farad. Soc. 63 777-780 (1967).

MEHLER, D. und TOEPFER, K. : Der Einfluß von anorganischen und organischen Salzen auf die Verbindung von Polysacchariden mit Thiazinfarbstoffen. Acta histochem. Suppl. (im Druck) (1971) XV. Symposion der Ges. für Histochemie, 8. - 12.9.1971 in Düsseldorf.

MEIER, H. : Die Photochemie der organischen Farbstoffe. In: Organische Chemie in Einzeldarstellungen. Hrsg.: H. BREDERECK und E. MÜLLER, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, Bd. 7, 1963.

MICHAELIS, L. : Metachromasie
In: EHRLICH, P., Enzykl. mikr. Technik Bd.II 77-82 2.Aufl., 1910.

MICHAELIS, L. : Enzyklopädie der mikroskopischen Technik.
Bd.II 1376-1380 3.Aufl., 1926.

MICHAELIS, L. : The nature of the interaction of nucleic acids and nuclei with basic dyestuffs.
Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. 12 131-142 (1947).

MICHAELIS, L. and GRANIK, S. : Metachromasy of basic dyestuffs.
J. Am. Chem. Soc.
67 1212-1219 (1945).

NETTER, H. : Theoretische Biochemie.
Physikalisch-chemische Grundlagen der Lebensvorgänge.
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1959.

PADDAY, J.F. : Metachromasy of dyes in solution.
In: Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix.
Vol. II 1007-1031
Hrsg.: E.A. BALAZS
Academic Press, London-NewYork, 1970.

PERSSON, B.H. : Studies on connective tissue ground substance.
Acta Soc. med. Upsal.
58 Suppl. 2, 1-104 (1953).

PESTEMER, M. und BRÜCK, D. : Absorptions-Spektroskopie im Sichtbaren und Ultraviolett.
In: HOUBEN-WEYL: Methoden der organischen Chemie.
Hrsg.: E. MÜLLER
Bd. III, Teil 2, 593-764, 4.Aufl.
Thieme-Verlag, Stuttgart, 1955.

PRAS, M. and SCHUBERT, M. : Metachromatic properties of amyloid in solution. J. Histochem. Cytochem. 17 258-265 (1969).

RABINOWITCH, E. and EPSTEIN, L.F. : Polymerization of dyestuffs in solution. Thiazine and methylene blue. J. Am. Chem. Soc. 63 69-78 (1941).

ROMANINI, M.G. : Contributions à l'étude histochemique des mucopolysaccharides. I. Gelée de Wharton et substance métachromatique des vaissaux. Acta anat. (Basel) 13 256-288 (1951).

SCHAUER, A. und SCHEIBE, G. : Über die Verwendung der reversibel polymeren Metachromasie von Pseudoisocyanin zur Gewebsfärbung. Histochemie 1 190-195 (1959).

SCHEIBE, G. : Reversible Polymerisation als Ursache neuartiger Absorptionsbanden von Farbstoffen. Kolloid.-Zschr. 82 1-14 (1938).

SCHEIBE, G. und ZANKER, V. : Physikochemische Grundlagen der Metachromasie. Acta histochem. Suppl. I 6-37 (1958).

SCHEIBE, G. und ZANKER, V. : Über die Metachromasie der Absorption und Fluoreszenz von Akridinfarbstoffen. Histochemie 3 122-126 (1962).

SCHMITZ-MOORMANN, P. : Untersuchungen über die Möglichkeiten der quantitativen Aminosäurenbestimmung aus der Gewebsbasophilie und -acidophilie an Feingewebsschnitten. Histochemie 15 370-382 (1968a).

SCHMITZ-MOORMANN, P. : Untersuchungen zur Gewebsfärbung mit basischen Farbstoffen. I. Einfluß des pH-Werts der Färbelösung und der Farbstoffaffinität auf die Farbstoffadsorption. Histochemie 16 23-35 (1968b).

SCHMITZ-MOORMANN, P. : Untersuchungen zur Gewebsfärbung mit basischen Farbstoffen. II. Einfluß der Ionenstärke und der ionalen Zusammensetzung der Färbelösung auf die Farbstoffadsorption. Histochemie 16 36-44 (1968c).

SCHMITZ-MOORMANN, P. : Untersuchungen zur Gewebsfärbung mit basischen Farbstoffen. III. Einfluß der Formalinfixierung und der reversiblen Eiweißreaktionen des Formalins auf die Farbstoffadsorption. Histochemie 18 61-69 (1969a).

SCHMITZ-MOORMANN, P. : Untersuchungen zur Gewebsfärbung mit basischen Farbstoffen. IV. Spektrometrische Untersuchungen basischer Farbstoffe. Histochemie 18 70-73 (1969b).

SCHUBERT, M. and LEVINE, A. : A qualitative theory of metachromasy in solution. J. Am. Chem. Soc. 77 4197-4201 (1955).

SHEPPARD, S.E. and GEDDES, A.L. : Effect of solvents upon the absorption spectra of dyes. IV. Water as solvent: a common pattern. J. Am. Chem. Soc. 66 1995-2002 (1944a).

SHEPPARD, S.E. and GEDDES, A.L. : Effect of solvents upon the absorption spectra of dyes. V. Water as solvent: quantitative examination of the dimerisation hypothesis. J. Am. Chem. Soc. 66 2003-2009 (1944b).

SPEK, J. : Metachromasie und Vitalfärbung mit pH-Indikatoren. Protoplasma 34 538 (1940).

STENRAM, U. : The specifity of the gallocyanin-chromalum stain for nucleic acids as studied by the ribo-nuclease technique. Exp. Cell. Res. 4 383-389 (1953).

STONE, A.L. and MOSS, H. : Anomalous rotatory dispersion of metachromatic mucopoly-saccharide-dye complexes. II. Heparin-methylene blue com-plexes at acidic pH. Biochem. Biophys. Acta 136 56-66 (1967).

STONE, A.L. and BRADLEY, D.F. : Aggregation of cationic dyes on acid polysaccharides. I. Spectrophotometric titration with acridine orange and other metachromatic dyes. Biochem. Biophys. Acta 148 172-192 (1967).

SYLVEN, B. : Metachromatic dye-substrate interactions. Quart. J. Micr. Sci. 95 327-358 (1954).

SYLVEN, B. : On the interaction between me-tachromatic dyes and various substrates of biological interest. Acta histochem. Suppl. I 79 - 85 (1958).

SYLVEN, B. and MALMGREN, H. : On the alleged metachromasia of hyaluronic acid. Lab. Invest. 1 413-430 (1952).

SZIRMAI, J.A. : Quantitative approaches in the histochemistry on mucopoly-saccharides. J. Histochem. a. Cytochem. 11 24-34 (1963).

SZIRMAI, J.A. and BALAZS, E.A. : Metachromasia and the quantitative determination of dyebinding. Acta histochem. Suppl. I 56-59 (1958).

SZIRMAI, J.A. and KLEIN, F. : Metachromasia and dyebinding of DNA and nucleoprotein. J. Histochem. a. Cytochem. 8 328-329 (1960).

SZIRMAI, J.A. and DOYLE, J. : Quantitative histochemical and chemical studies on the composition of cartilage. J. Histochem. a. Cytochem. 9 611 (1961).

SZIRMAI, J.A., VAN BOVEN-DE TYSSONSK, E. GARDELL, S. : Microchemical analysis of glycoaminoglycans, collagen, total protein and water in histochemical layers of nasal septum cartilage. Biochem. Biophys. Acta 136 331-350 (1967).

TAYLOR, K.B. and JEFFREE, G.M. : A new basic metachromatic dye, 1:9-dimethyl methylene blue. Histochemical Journal 1 199-201 (1969).

Thiazine : Farbstoffe in Medizin und Biologie. Deutsche Normen. Beuth-Vertrieb GmbH, Berlin-Köln. DIN 58981, Blatt 1, Januar 1972.

TOEPFER, K. : Eine einfache Methode zur spektralen Beobachtung von konzentrierten Farbstofflösungen in geringsten Schichtdicken. Acta histochem. 31 111-116 (1968).

TOEPFER, K. : Kritische Bemerkungen zur Verwendung der Farbstoffe Azur A und Azur C in der Histochemie. Verh. d. Anat. Ges. Erg.-H. Anat. Anz., Jena 126 93-100 (1970a).

TOEPFER, K. : Spektralphotometrische und histochemische Eigenschaften von 1:9 Dimethyl-Methylenblau als metachromatischer Farbstoff. Histochemie 21 64-72 (1970b).

TOEPFER, K. : Die Thiazinfarbstoffe. Eigenschaften und Verhalten unter experimentellen Bedingungen. In: Progress in Histochemistry and Cytochemistry Vol. I/No.5 Hrsg.: W. GRAUMANN, Z. LOJDA, A.G.E. PEARSE und T.H. SCHIEBLER Fischer-Verlag, Stuttgart, 1970c.

TOEPFER, K. : Die Standardisierung von Thiazinfarbstoffen. Acta histochem. Suppl. X 215-223 (1971).

TOEPFER, K. : Untersuchungen über die Wirkung von Nukleinsäuren auf die metachromatische Reaktion. Acta histochem. Suppl. (im Druck) (1971) XV. Symposion der Ges. für Histochemie 8. - 12.9.1971 in Düsseldorf.

TOEPFER, K. : Zur Frage der Objektivierbarkeit der metachromatischen Reaktion; in vitro Untersuchungen. Acta histochem. Suppl. XII 147-156 (1972a).

TOEPFER, K. : Das quantitative Verhältnis von Thiazinfarbstoffen zu verschiedenen Chromotropen (Heparin u.a.) bei der Ausbildung der metachromatischen Reaktion. Acta histochem. Suppl. XII 309-313 (1972b).

VARUTE, A.T. and NANAWARE, S.G. : Histochemical analysis of alcohol-lability and effects of inorganic ions on the metachromasia of galactogen. Histochemie 30 24-30 (1972a).

VARUTE, A.T. and NANAWARE, S.G. : Suppression of metachromasia of galactogen by organic solvents and its relation to their dielectric constants. Histochemie 30 367-370 (1972b).

WALTON, K.W. and RICKETTS, C.R. : Investigation of the histochemical basis of metachromasia. Brit. J. Exper. Path. 35 227-240 (1954).

WINCKLER, J. : Kontrollierte Gefriergetrocknung von Kryostatschnitten. Histochemie 22 234-240 (1970a).

WINCKLER, J. : Verwendung gefriergetrockneter Kryostatschnitte für histologische und histochemische Untersuchungen. Histochemie 24 168-186 (1970b).

WISLOCKI, G.B. and DEMPSEY, E.W. : Observation on the chemical cytology of normal blood and hemopoetic tissues. Anat. Rec. 96 249-278 (1946).

WOOHSMANN, H. : Der Stand des Metachromasieproblems. Protoplasma 45 618-629 (1955/56).

ZANKER, V. : Über den Nachweis definierter reversibler Assoziate ("reversibler Polymerisate") des Akridinorange durch Absorptions- und Fluoreszenzmessungen in wässriger Lösung. Z. physikal. Chemie 199,4 225-258 (1952a).

ZANKER, V. : Quantitative Absorptions- und Emmissionsmessungen am Akridinorange-Kation bei Normal- und Tieftemperatur im organischen Lösungsmittel und ihr Beitrag zur Deutung des metachromatischen Fluoreszenzproblems. Z. physikal. Chemie 200 250-292 (1952b).

ZANKER, V. : Über die Akridinfarbstoffe. Habilitationsarbeit Fak. Allgem. Wissenschaften Technische Hochschule München, 1954.

ZANKER, V. : I. Die Tieftemperaturspektren einiger homologer sechsgliedriger N-Heterocyklen und ihre Entwicklung zu den Spektren der Akridinfarbstoffe. Z. physikal. Chemie, Neue Folge 2 52-78 (1954).

ZANKER, V. : Diskussionsbemerkung. Acta histochem. Suppl. I 35 (1958).

ZANKER, V. : Allgemeine Grundlage der Photometrie und Spektrometrie. Kolloquium über "Physikalisch-optische Methoden in der Histochemie". Acta histochem. 9 97-168 (1960).

ZANKER, V. : Spektroskopie im Sichtbaren und Ultraviolett. In: ULLMANN's Enzyklopädie der technischen Chemie. Hrsg.: W. FOERST Verlag Urban & Schwarzenberg München-Berlin, 1961 Bd. 2/I 198-235 3.Aufl.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. K. TOEPFER für die Überlassung des Themas sowie für die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung und Beratung bei der Durchführung dieser Arbeit meinen besonderen Dank aussprechen.

Fräulein SAUERBIER danke ich für die sorgfältige Durchführung der Photoarbeiten.

Für die Überlassung ihrer Produkte (z.T. in Reinsubstanz) bin ich den Firmen Bene-Chemie (München) und Deutsche Kabi (München) zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 4.3.1941 wurde ich als erstes von drei Kindern des Studienrats Karl Funk und seiner Ehefrau Theresia Funk, geb. Ruf, in Dinkelsbühl geboren.
Dort besuchte ich die Grundschule. Nach dem Abitur im März 1962 am mathematisch-naturwissenschaftlichen Humboldt-Gymnasium in Bremerhaven leistete ich meine Wehrpflicht bei der Bundes-Luftwaffe ab, die ich im März 1964 als Leutnant der Reserve verließ. Ich begann das Studium der Zahnmedizin im Sommersemester 1964 an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Am 12.10.1967 legte ich dort die zahnärztliche Vorprüfung ab.
Meine klinische Ausbildung an der Freien Universität Berlin endete am 23.7.1970 mit der zahnärztlichen Prüfung.
Seit der Bestallung als Zahnarzt im August 1970 arbeite ich in Berlin als Assistent in freier Praxis.
Am 2. August 1968 erfolgte meine Eheschließung mit Erika Funk, geb. Detter.